



日本国特許庁

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 2月15日

出願番号

Application Number:

特願2002-039254

[ST.10/C]:

[JP2002-039254]

出願人

Applicant(s):

キヤノン株式会社

2002年 3月22日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造

出証番号 出証特2002-3019198

【書類名】 特許願

【整理番号】 4642003

【提出日】 平成14年 2月15日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12P 7/62
C07C 51/00

【発明の名称】 新規化合物 5 - [(4 - フルオロフェニル) スルファニ
ル] 吉草酸、側鎖に置換されたフェニルスルファニル構
造を有するユニットを含む新規なポリヒドロキシアルカ
ノエート、およびその製造方法

【請求項の数】 25

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会
社内

【氏名】 見目 敬

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会
社内

【氏名】 今村 剛士

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会
社内

【氏名】 本間 務

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会
社内

【氏名】 矢野 哲哉

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会

社内

【氏名】 須川 悦子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内

【氏名】 鈴木 智博

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内

【氏名】 野本 毅

【特許出願人】

【識別番号】 000001007

【氏名又は名称】 キヤノン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088328

【弁理士】

【氏名又は名称】 金田 暢之

【電話番号】 03-3585-1882

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 克博

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138

【弁理士】

【氏名又は名称】 石橋 政幸

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2001- 57145

【出願日】 平成13年 3月 1日

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2001-210049

【出願日】 平成13年 7月10日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 089681

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9705032

【プルーフの要否】 要

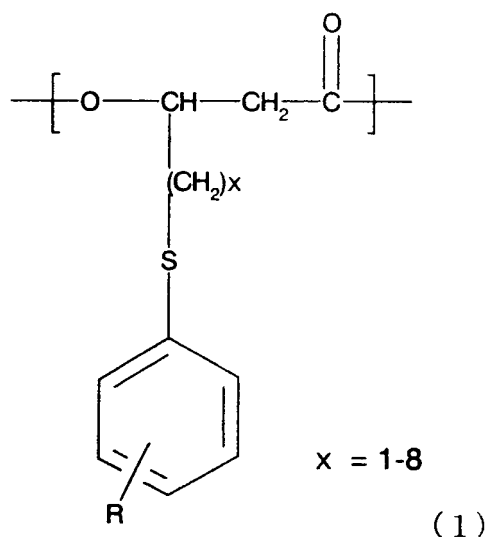
【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規化合物 5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル] 吉草酸、側鎖に置換されたフェニルスルファニル構造を有するユニットを含む新規なポリヒドロキシアлкаノエート、およびその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 化学式(1)に示すユニットを分子中に含むことを特徴とするポリヒドロキシアлкаノエート。

【化 1】



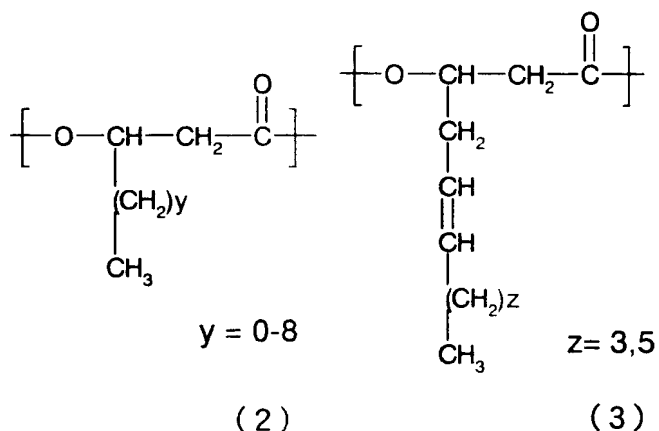
但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」から任意に選択される。

また、xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。

【請求項 2】 化学式(1)に示すユニット以外に、化学式(2)及び(3)に示すユニットの少なくとも一方を含む、請求項 1 に記載のポリヒドロキシアлкаノエート。

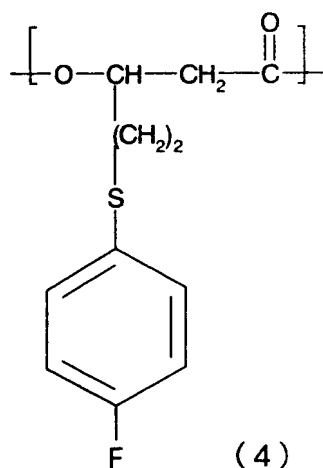
【化 2】



(y及びzは(1)で示すユニットと独立して化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る。)

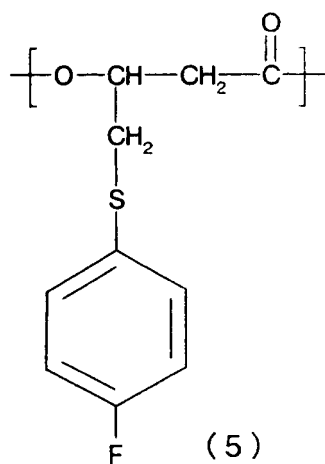
【請求項 3】 化学式(4)に示す、3-ヒドロキシ-5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル] 吉草酸ユニットを含む請求項 1 または 2 に記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【化 3】



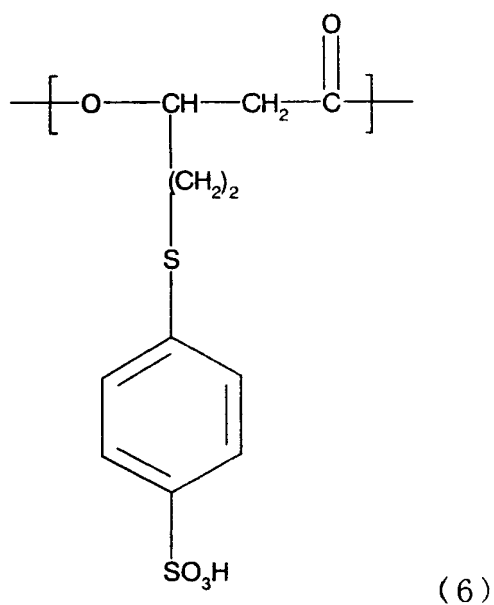
【請求項 4】 化学式(5)に示す、3-ヒドロキシ-4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル] 酪酸ユニットを含む請求項 1 から 3 のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【化 4】



【請求項 5】 化学式(6)に示す、3-ヒドロキシ-5-[(4-スルホフェニル)スルファニル] 吉草酸ユニットを含む請求項 1 から 3 のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエート。

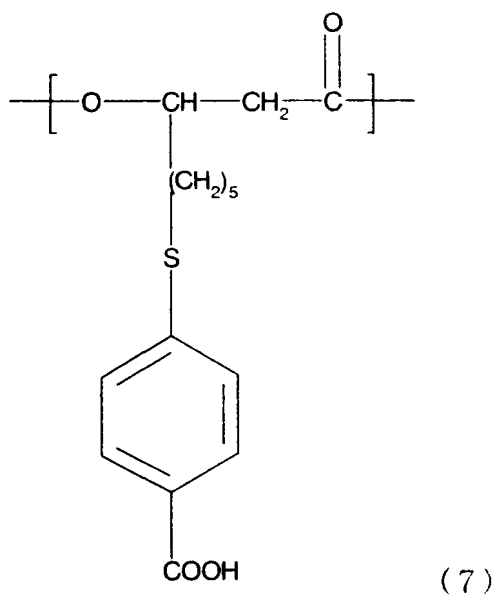
【化 5】



【請求項 6】 化学式(7)に示す、3-ヒドロキシ-8-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル] オクタン酸ユニットを含む請求項 1 から 3 のいずれかに記載

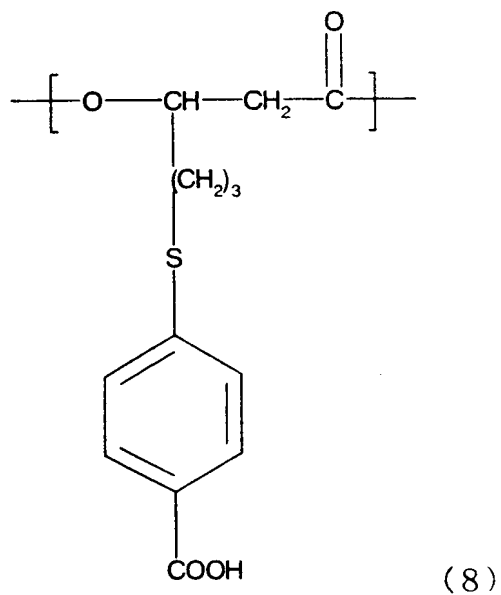
のポリヒドロキシアлкаノエート。

【化 6】



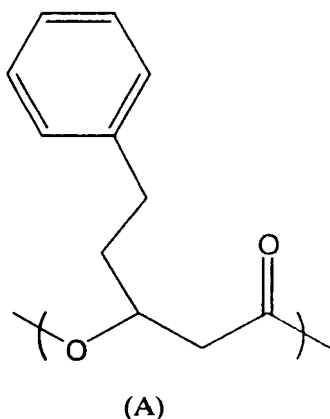
【請求項 7】 化学式(8)に示す、3-ヒドロキシ-6-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル]ヘキサン酸ユニットを含む請求項 1 から 3 のいずれかに記載のポリヒドロキシアлкаノエート。

【化 7】



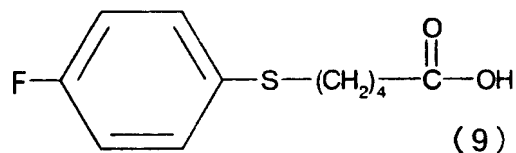
【請求項 8】 化学式(7)に示す、3-ヒドロキシ-8-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル]オクタン酸ユニット、あるいは化学式(8)に示す、3-ヒドロキシ-6-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル]ヘキサン酸ユニット以外に、化学式(A)に示す、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸ユニットを含む請求項 7 もしくは 8 のいずれかに記載のポリヒドロキシアлкаノエート。

【化 8】



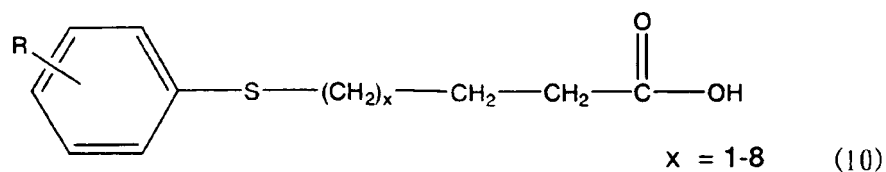
【請求項 9】 化学式(9)に示す 5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]吉草酸。

【化 9】



【請求項 10】 化学式(10)に示す化合物を少なくとも一種以上含む培地中で微生物を培養することを特徴とする、化学式(1)に示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法。

【化 10】

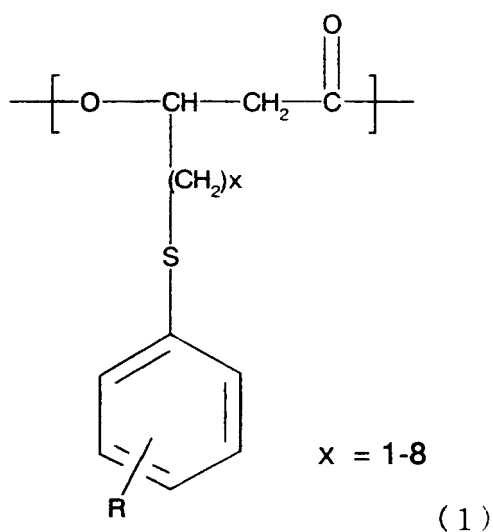


(但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」から任意に選択される。

また、xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【化 11】



(但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅;

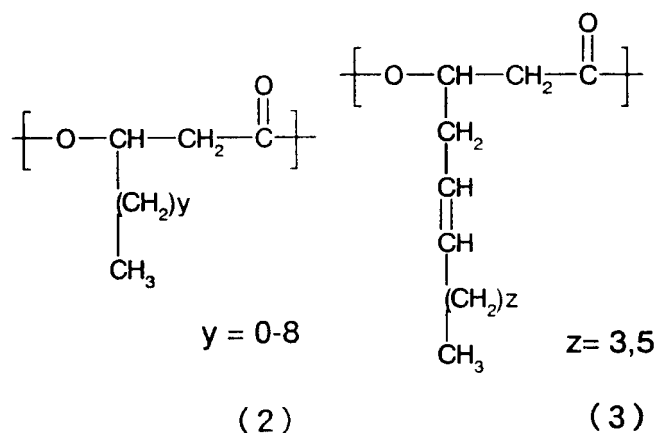
R'':OH、ONa、OK、ハロゲン原子、

OCH₃、OC₂H₅)」から任意に選択される。

また、xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【請求項 11】 化学式(1)に示すユニット以外にのユニットとして、化学式(2)及び(3)に示すユニットの少なくとも一方を含む、請求項 11 に記載のポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法。

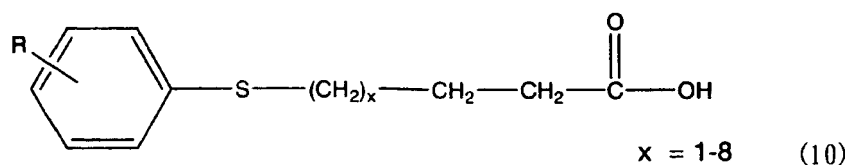
【化 12】



(y及びzは(1)で示すユニットと独立して化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る。)

【請求項 12】 化学式(10)に示す化合物を少なくとも一種類以上含み、かつポリペプトンを含む培地中で微生物を培養する工程(工程 1-1)と、これに続く、化学式(10)に示す化合物を少なくとも一種類以上含み、かつ有機酸或いはその塩とを含む培地中で、工程 1-1 で培養された微生物を更に培養する工程(工程 2-1)を行なうことを特徴とする、化学式(1)に示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法。

【化 13】



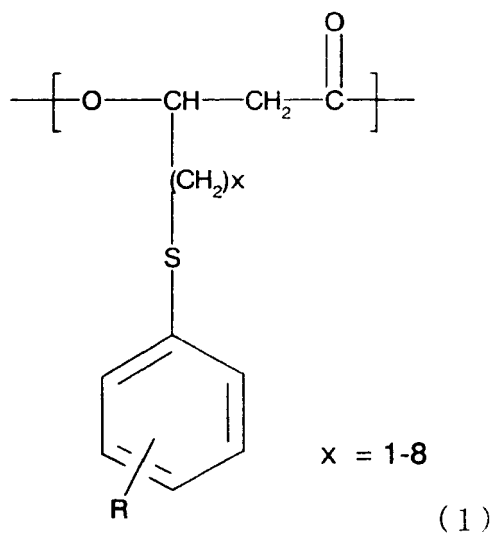
(但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R」

(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R":OH、ONa、OK、ハロゲン原子、O

CH₃、OC₂H₅)」から任意に選択される。

また、xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【化 1 4】



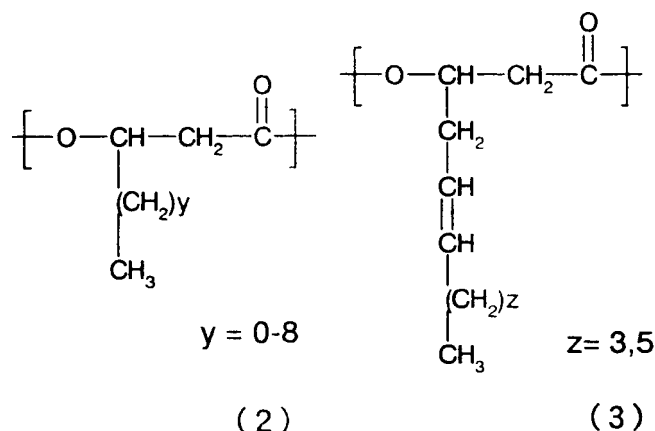
但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」から任意に選択される。

また、xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。

【請求項 1 3】 化学式(1)に示すユニット以外のユニットとして、化学式(2)及び(3)に示すユニットの少なくとも一方を含む、請求項 2 2 に記載のポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法。

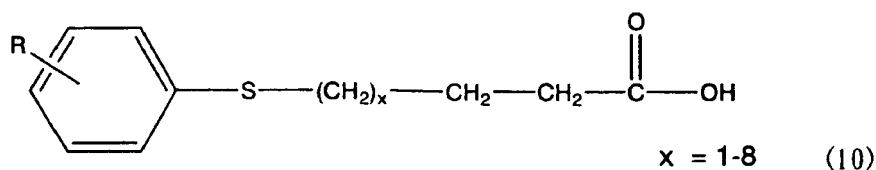
【化 1 5】



(y及びzは(1)で示すユニットと独立して化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る。)

【請求項 1 4】 化学式(10)に示す化合物を少なくとも一種類以上含み、かつ糖類を含む培地中で微生物を培養する工程(工程 1-2)と、これに続く、化学式(10)に示す化合物を少なくとも一種類以上含み、また糖類を含む培地中で、工程 1-2 で培養された微生物を更に培養する工程(工程 2-2)を行なうことを特徴とする、化学式(1)に示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアリカノエートの製造方法。

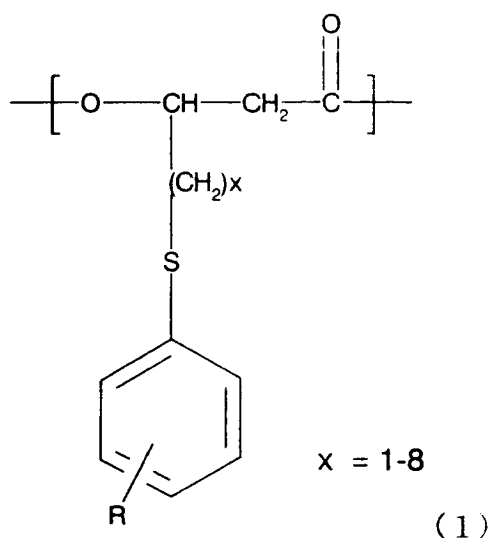
【化 1 6】



(但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R」
(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R":OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」から任意に選択される。

また、xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【化 17】



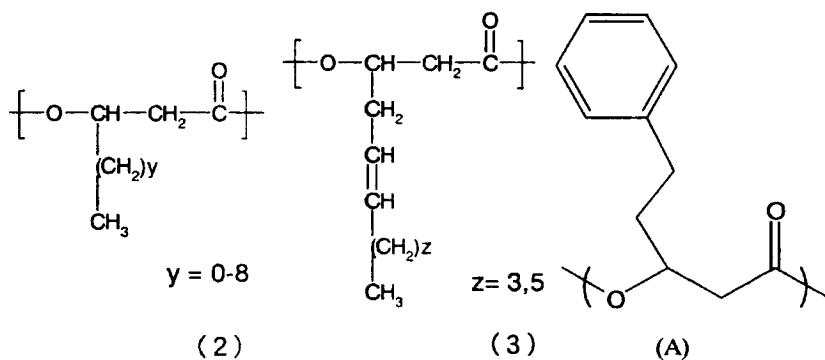
(但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」から任意に選択される。

また、xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【請求項15】 化学式(1)に示すユニット以外のユニットとして、化学式(2)及び(3)及び(A)に示すユニットの少なくとも一つを含む、請求項25に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

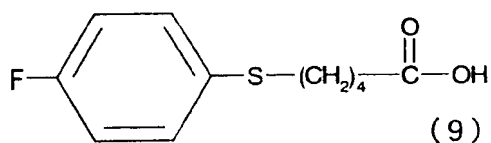
【化 18】



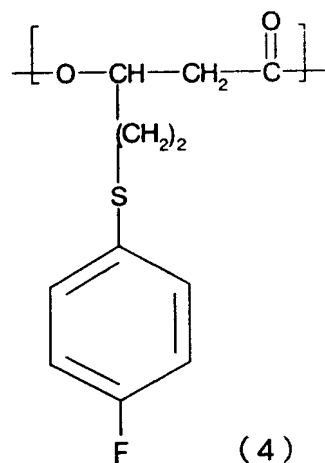
(y及びzは(1)で示すユニットと独立して化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る。)

【請求項 1 6】 化学式(9)に示す 5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]吉草酸を含む培地中で微生物を培養し、化学式(4)に示す 3-ヒドロキシ-5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]吉草酸ユニットを含むポリヒドロキシア
ルカノエートを生産することを特徴とする、請求項 1 1 から 2 7 のいずれかに記載のポリヒドロキシア
ルカノエートの製造方法。

【化 1 9】

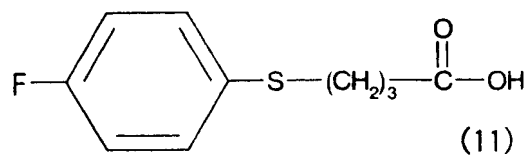


【化 2 0】

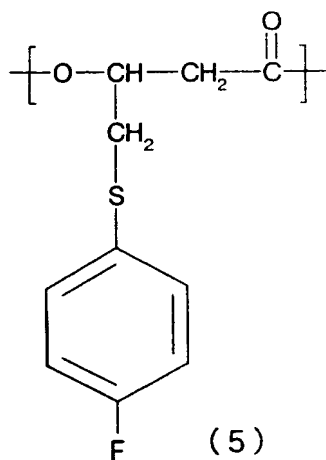


【請求項 1 7】 化学式(11)に示す 4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]酪酸を含む培地中で微生物を培養し、化学式(5)に示す 3-ヒドロキシ-4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]酪酸ユニットを含むポリヒドロキシア
ルカノエートを生産することを特徴とする、請求項 1 1 から 2 7 のいずれかに記載のポリヒドロキシア
ルカノエートの製造方法。

【化 2 1】

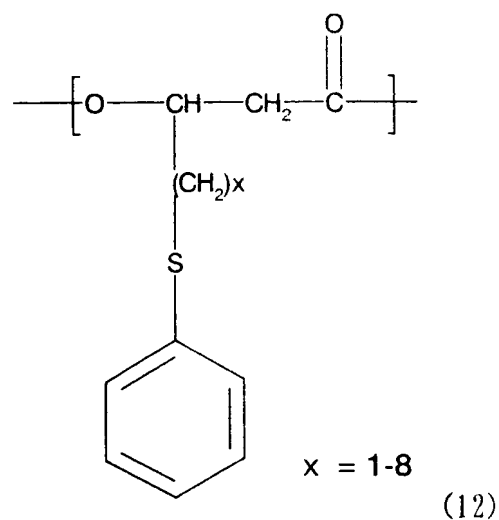


【化 2 2】



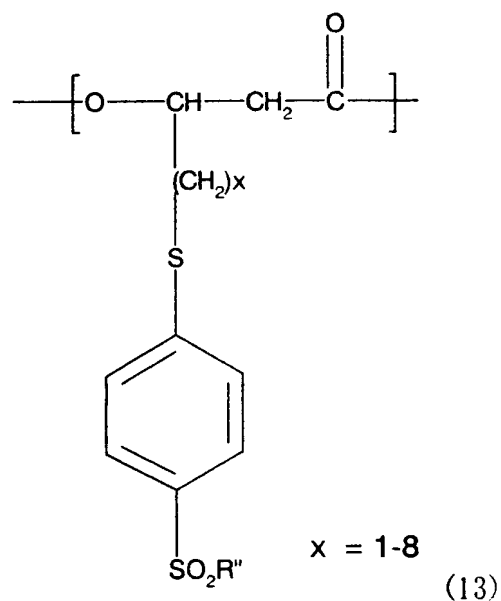
【請求項 1 8】 化学式(1 2)に示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートをクロロ硫酸によりスルホン化する工程を有することを特徴とする、化学式(1 3)に示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化 2 3】



(xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【化 2 4】



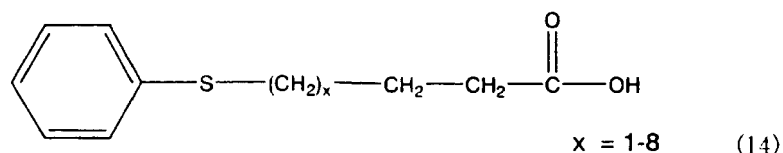
(但し、R''は「OH、ONa、OK」から任意に選択される。

また、xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【請求項 19】 化学式(12)に示す化合物が、化学式(14)に示す化合物の少なくとも一種以上を含む培地中で微生物を培養する工程を含む方法で製造

される、請求項 3 1 に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

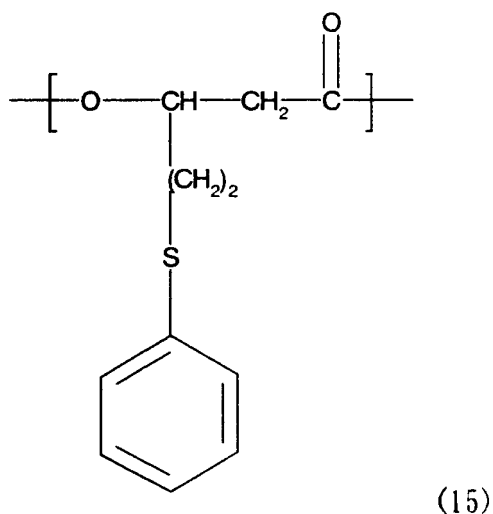
【化 2 5】



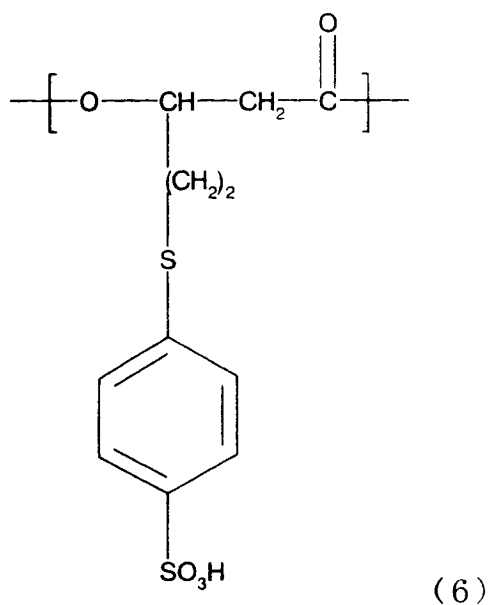
(xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【請求項 2 0】 化学式(1 5)に示す 3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルファニル)吉草酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートをクロロ硫酸によりスルホン化する工程を有する方法により、化学式(6)に示す、3-ヒドロキシ-5-[(4-スルホフェニル)スルファニル]吉草酸ユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートを製造することを特徴とする、請求項 3 1 または 3 2 に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化 2 6】

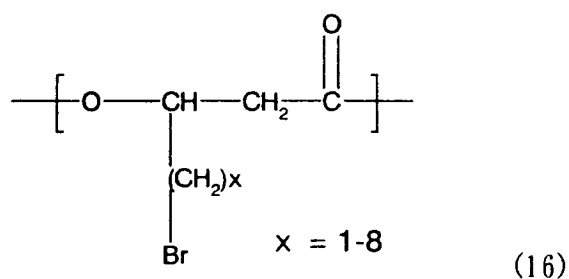


【化 2 7】



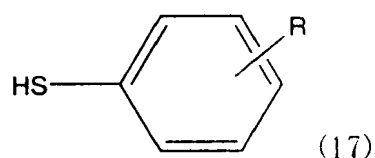
【請求項 2 1】 化学式(1 6)に示す、3-ヒドロキシ- ω -プロモアルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートと、化学式(1 7)に示す、置換ベンゼンチオールを反応させる工程を有することを特徴とする、化学式(1)に示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法。

【化 2 8】



(xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

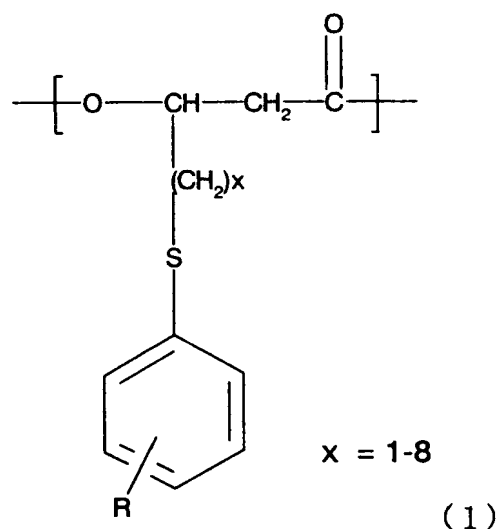
【化 29】



(但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」から任意に選択される。)

【化 30】



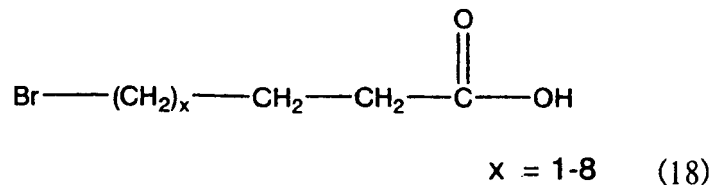
(但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」から任意に選択される。

また、xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【請求項 22】 化学式(16)に示す、3-ヒドロキシ-ω-ブロモアルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートが、化学式(18)に示すω-ブロモアルカン酸の少なくとも一種以上を含む培地中で微生物を培養する工程を含む方法で製造される、請求項 34 に記載のポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法。

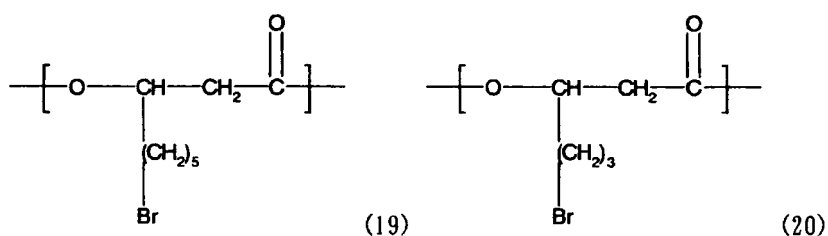
【化 3 1】



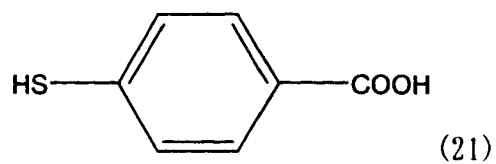
(xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【請求項 2 3】 化学式(19)に示す、3-ヒドロキシ-8-ブロモオクタン酸ユニット、化学式(20)に示す、3-ヒドロキシ-6-ブロモヘキサン酸ユニットの少なくとも一方を含むポリヒドロキシアルカノエートと、化学式(21)に示す、4-メルカプト安息香酸を反応させる工程を有する方法により、化学式(7)に示す、3-ヒドロキシ-8-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル]オクタン酸ユニット、化学式(8)に示す、3-ヒドロキシ-6-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル]ヘキサン酸ユニットの少なくとも一方を分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートを製造することを特徴とする請求項 3 4 または 3 5 に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

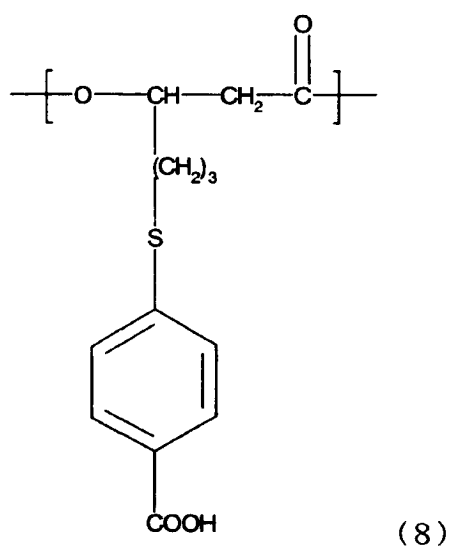
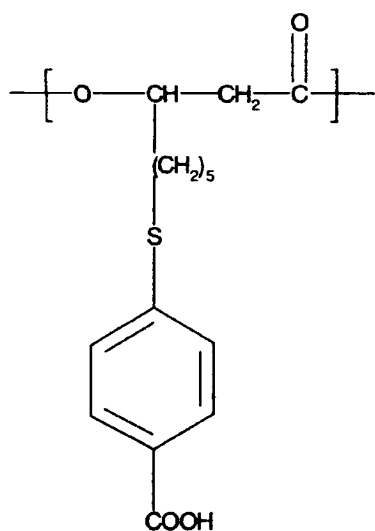
【化 3 2】



【化 3 3】

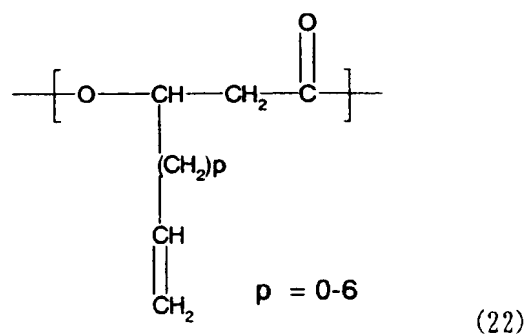


【化 3 4】



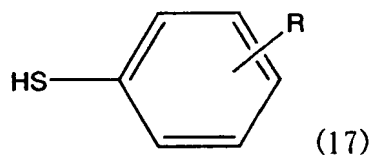
【請求項 2 4】 化学式(2 2)に示す、3-ヒドロキシ- ω -アルケン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートと、化学式(1 7)に示す、置換ベンゼンチオールを反応させる工程を有することを特徴とする、化学式(2 3)に示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化 3 5】



(pは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

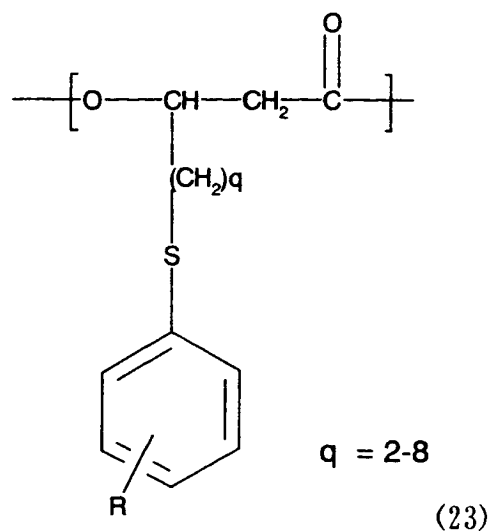
【化 3 6】



(但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」から任意に選択される。)

【化 3 7】



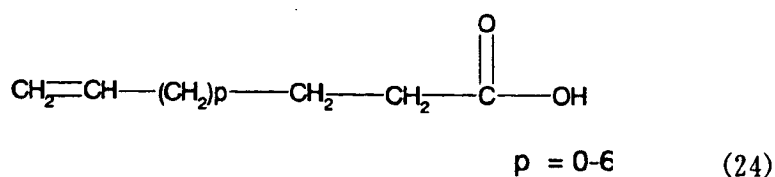
(但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」から任意に選択される。

また、qは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【請求項 2 5】 化学式(2 2)に示す、3-ヒドロキシ- ω -アルケン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートが、化学式(2 4)に示す ω -アルケン酸の少なくとも一種類以上を含む培地中で微生物を培養する工程を含む方法で製造される、請求項 3 7に記載のポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法。

【化 3 8】



(pは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なポリヒドロキシアルカノエート(以下、PHAと略す)に関する。また、PHAを生産し菌体内に蓄積する能力を有する微生物を用いたPHAの生産工程を含む当該PHAの製造方法に関する。

【0002】

【背景技術】

これまで、多くの微生物がポリ-3-ヒドロキシ酪酸(PHB)あるいはその他のPHAを生産し、菌体内に蓄積することが報告されてきた(「生分解性プラスチックハンドブック」, 生分解性プラスチック研究会編, (株)エヌ・ティー・エス, P178-197(1995))。これらのポリマーは従来のプラスチックと同様に、溶融加工等により各種製品の生産に利用することができる。さらに、生分解性であるがゆえに、自然界で微生物により完全分解されるという利を有しており、従来の多くの合成高分子化合物のように自然環境に残留して汚染を引き起こすことがない。また、生体適合性にも優れており、医療用軟質部材等としての応用も期待されている。

【0003】

このような微生物産生PHAは、その生産に用いる微生物の種類や培地組成、培養条件等により、様々な組成や構造のものとなり得ることが知られており、これまで主に、PHAの物性の改良という観点から、このような組成や構造の制御に関する研究がなされてきた。

【0004】

[1]まず、3-ヒドロキシ酪酸(以下、3HBと略す)をはじめとする比較的簡単な構造のモノマーユニットを重合させたPHAの生合成としては、次のものが挙げられる。

【0005】

(a) 3HBと3-ヒドロキシ吉草酸(以下3HV)を含むもの

特公平6-15604号公報、特公平7-14352号公報、特公平8-19227号公報等；

特開平 5 - 7492 号公報

(b) 3 H B と 3 - ヒドロキシヘキサン酸 (以下 3 H H x) を含むもの

特開平 5 - 93049 号公報、及び特開平 7 - 265065 号公報

(c) 3 H B と 4 - ヒドロキシ酪酸 (以下 4 H B) を含むもの

特開平 9 - 191893 号公報

(d) 炭素数 6 から 12 までの 3 - ヒドロキシアルカノエートを含むもの

特許公報第 2642937 号

(e) 単一の脂肪酸を炭素源とした生合成。生産物は (d) とほぼ同様

Appl. Environ. Microbiol., 58 (2), 746 (1992)

等が挙げられる。これらはいずれも微生物による炭化水素等の β 酸化や糖からの脂肪酸合成により合成された、いずれも側鎖にアルキル基を有するモノマーユニットからなる P H A、即ち、「usual P H A」である。

【 0 0 0 6 】

[2] しかし、このような微生物産生 P H A のより広範囲な応用、例えば機能性ポリマーとしての応用を考慮した場合、アルキル基以外の置換基を側鎖に導入した P H A 「unusual P H A」が極めて有用であることが期待される。置換基の例としては、芳香環を含むもの (フェニル基、フェノキシ基、など) や、不飽和炭化水素、エステル基、アリル基、シアノ基、ハロゲン化炭化水素、エポキシドなどが挙げられる。これらの中でも、特に、芳香環を有する P H A の研究が盛んになされている。

【 0 0 0 7 】

(a) フェニル基もしくはその部分置換体を含むもの

Makromol. Chem., 191, 1957 - 1965 (1990) 及び Macromolecules, 24, 5256 - 5260 (1991) には、5 - フェニル吉草酸を基質として、シュードモナス オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) が 3 - ヒドロキシ - 5 - フェニル吉草酸をユニットとして含む P H A を生産することが報告されている。

【 0 0 0 8 】

Macromolecules, 29, 1762 - 1766 (1996) には、5 - (4 ' - トリル) 吉草酸を基質として、シュードモナス オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) が 3 - ヒド

ロキシ-5-(4'-トリル)吉草酸をユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。

【0009】

Macromolecules, 32, 2889-2895 (1999)には、5-(2', 4'-ジニトロフェニル)吉草酸を基質として、シュードモナス オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) が3-ヒドロキシ-5-(2', 4'-ジニトロフェニル)吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4'-ニトロフェニル)吉草酸をユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。

【0010】

(b) フェノキシ基もしくはその部分置換体を含むもの

Macromol. Chem. Phys., 195, 1665-1672 (1994)には、11-フェノキシウンデカン酸を基質として、シュードモナス オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) が3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸と3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸のPHAコポリマーを生産することが報告されている。

【0011】

特許公報第2989175号には、3-ヒドロキシ、5-(モノフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5(MFP)P)ユニットあるいは3-ヒドロキシ、5-(ジフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5(DFP)P)ユニットからなるホモポリマー、少なくとも3H5(MFP)Pユニットあるいは3H5(DFP)Pユニットを含有するコポリマー；これらのポリマーを合成するシュードモナス・プチダ；シュードモナス属を用いた前記のポリマーの製造法に関する発明が開示されており、その効果として、置換基をもつ長鎖脂肪酸を資化して、側鎖末端が1から2個のフッ素原子が置換したフェノキシ基をもつポリマーを合成することができ、融点が高く良い加工性を保持しながら、立体規則性、撥水性を与えることができるとしている。

【0012】

この様なフッ素基置換体以外に、シアノ基やニトロ基の置換体の研究もなされている。

【0013】

Can. J. Microbiol., 41, 32-43(1995)及び Polymer International, 39, 205-213(1996)には、シュードモナス オレオボランス(*Pseudomonas oleovorans*) ATCC 29347株及びシュードモナス プチダ(*Pseudomonas putida*) K T 2442株を用いて、オクタン酸とp-シアノフェノキシヘキサン酸或いはp-ニトロフェノキシヘキサン酸を基質として、3-ヒドロキシ-p-シアノフェノキシヘキサン酸或いは3-ヒドロキシ-p-ニトロフェノキシヘキサン酸をモノマーユニットとして含むPHAの生産が報告されている。

【0014】

これらの報告は側鎖がアルキル基である一般的なPHAとは異なり、いずれもPHAの側鎖に芳香環を有しており、それに由来する物性を有するポリマーを得る上で有益である。

【0015】

[3]また新たなカテゴリーとして、単に物性の変化に留まらず、側鎖に適当な官能基を有するPHAを生産し、その官能基を利用して新たな機能を生み出そうとする研究も行なわれている。

【0016】

例えばMacromolecules, 31, 1480-1486(1996)及び、Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, 36, 2381-2387(1998)などでは、側鎖の末端にビニル基を持つユニットを含むPHAを合成した後、酸化剤によりエポキシ化し、側鎖末端に反応性の高いエポキシ基を含むPHAを合成出来たと報告されている。

【0017】

またビニル基以外にも、高い反応性が期待されるチオエーテル(-S-; スルファニル結合)を持つユニットを含むPHAの合成例として、Macromolecules, 32, 8315-8318(1999)においては、シュードモナス プチダ(*Pseudomonas putida*) 27N01株が 11-チオフェノキシウンデカン酸(11-(フェニルスルファニル)ウンデカン酸)を基質とし、3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸(3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルファニル)吉草酸)及び3-ヒドロキシ-7-チオフェノキシヘプタン酸(3-ヒドロキシ-7-(フェニルスルファニル)ヘプタン酸)のPHAコポリ

マーを生産することが報告されている。

【0018】

【本発明が解決しようとする課題】

これらのうち、3-ヒドロキシ-チオフェノキシアルカン酸(3-ヒドロキシ-(フェニルスルファニル)アルカン酸)ユニットを含むPHAに注目した場合、チオエーテル(-S-;スルファニル結合)の反応性の高さから、機能性PHAを開発していく上で今後益々研究がなされていくものと予想される。しかし、このような種類のPHAに関しては上に挙げた1例の報告があるに過ぎない。更に上記の方法は、炭素鎖長が長いカルボン酸を原料とし、微生物中で2炭素ずつ短縮していく β 酸化系を利用し、原料よりも炭素鎖の短い3-ヒドロキシアルカン酸をポリマーのユニットとして取り込ませているため、ポリマー構造の制御が困難であるという問題があった。更に、このようなユニットを含むPHAの用途を拡大していくためには、用途に応じた物理化学的性質を有する必要がある。そのためには、芳香環部分に様々な機能性置換基を有する3-ヒドロキシ-(フェニルスルファニル)アルカン酸ユニットを含むPHAの開発が必要であるが、そのようなPHAはこれまで報告されていなかった。

【0019】

本発明の目的は、芳香環部分に機能性置換基を有する3-ヒドロキシ-(フェニルスルファニル)アルカン酸ユニットを含む新規なポリヒドロキシアルカノエート、およびその製造方法を提供することにある。更には、その原料である、芳香環部分に機能性置換基を有する(フェニルスルファニル)アルカン酸、およびその製造方法を提供することにある。

【0020】

【課題を解決するための手段】

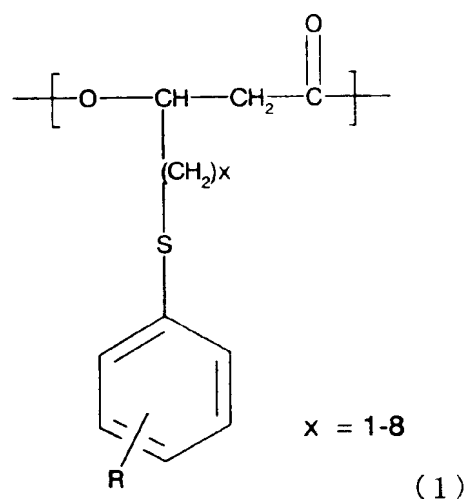
そこで本発明者らは、デバイス材料や医療用材料等の先端技術分野の材料として有用であると考えられる、芳香環部分に機能性置換基を有する3-ヒドロキシ-(フェニルスルファニル)アルカン酸ユニットを含む新規なポリヒドロキシアルカノエートの開発をめざして鋭意研究を重ねてきた結果以下に示すような発明に至った。即ち本発明の概要は以下の通りである。

【0021】

本発明は、化学式(1)に示すユニットを分子中に含むことを特徴とするポリヒドロキシアлкаノエートに関するものである。

【0022】

【化39】



【0023】

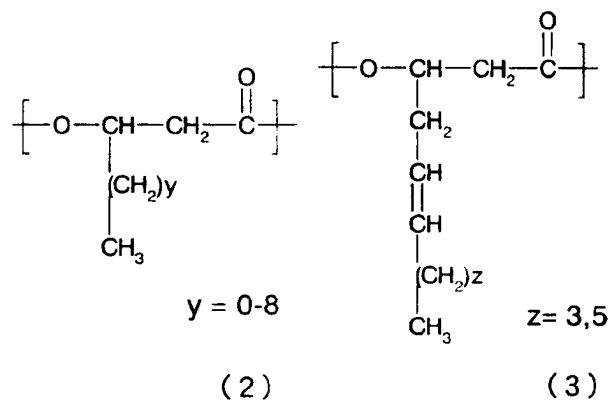
(但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''」
(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」から任意に選択される。
また、xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【0024】

本発明のポリヒドロキシアлкаノエートは、化学式(1)に示すユニット以外に、化学式(2)及び(3)に示すユニットの少なくとも一方を含んでもよい。

【0025】

【化 4 0】



【0 0 2 6】

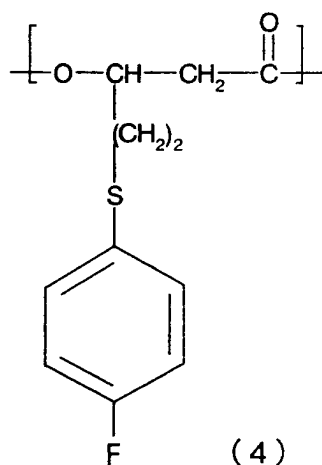
(y及びzは(1)で示すユニットと独立して化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る。)

【0 0 2 7】

その中でも特に、化学式(4)に示す、3-ヒドロキシ-5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル] 吉草酸ユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエート、

【0 0 2 8】

【化 4 1】

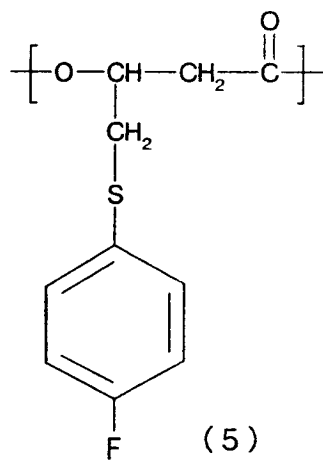


【0 0 2 9】

化学式(5)に示す、3-ヒドロキシ-4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]
酪酸ユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエート、

【0030】

【化42】

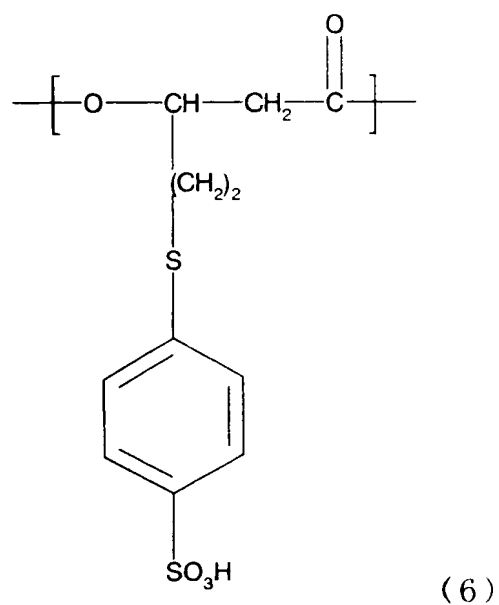


【0031】

化学式(6)に示す、3-ヒドロキシ-5-[(4-スルホフェニル)スルファニル] 吉
草酸ユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエート、

【0032】

【化 4 3】

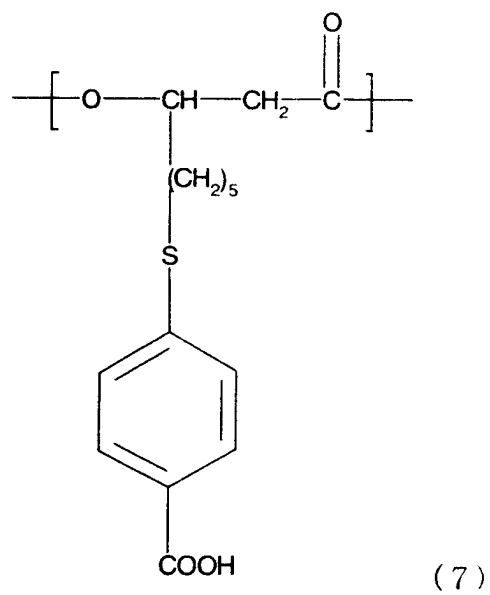


【0 0 3 3】

化学式(7)に示す、3-ヒドロキシ-8-[(4-カルボキシフェニル)スルファニ
ル]オクタン酸ユニットを含むポリヒドロキシアリカノエート、

【0 0 3 4】

【化 4 4】

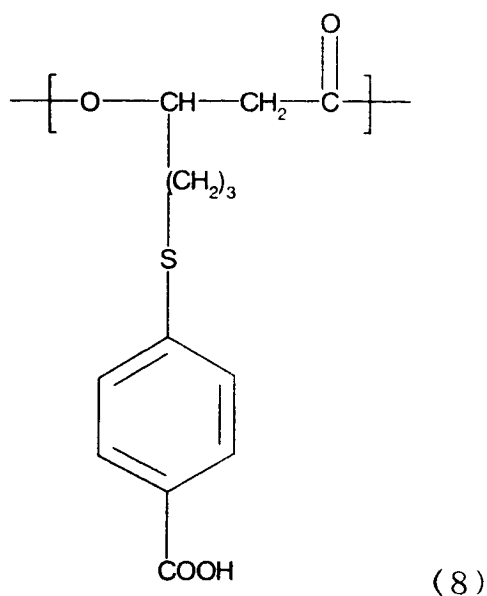


【0 0 3 5】

化学式(8)に示す、3-ヒドロキシ-6-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル]ヘキサン酸ユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエートに関するものである。

【0 0 3 6】

【化 4 5】

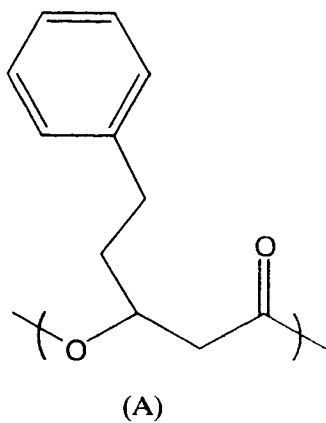


【0 0 3 7】

その中でも特に、化学式(7)に示す、3-ヒドロキシ-8-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル]オクタン酸ユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート、あるいは化学式(8)に示す、3-ヒドロキシ-6-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル]ヘキサン酸ユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートは、化学式(7)、化学式(8)以外に、化学式(A)に示す、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸ユニットを含んでも良い。

【0 0 3 8】

【化 4 6】

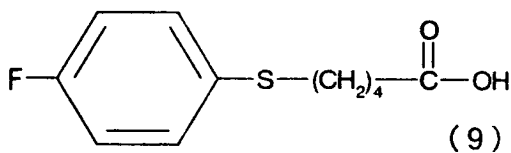


【 0 0 3 9 】

また、新規化合物である、化学式(9)に示す、5-(4-フルオロフェニルスルファニル)吉草酸に関するものである。

【 0 0 4 0 】

【化 4 7】

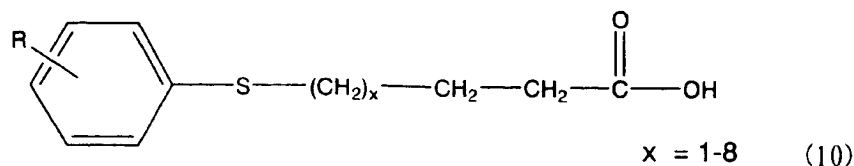


【 0 0 4 1 】

さらに、化学式(10)に示す化合物を少なくとも一種以上含む培地中で微生物を培養することを特徴とする、化学式(1)に示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法に関するものである。

【 0 0 4 2 】

【化 4 8】



【0 0 4 3】

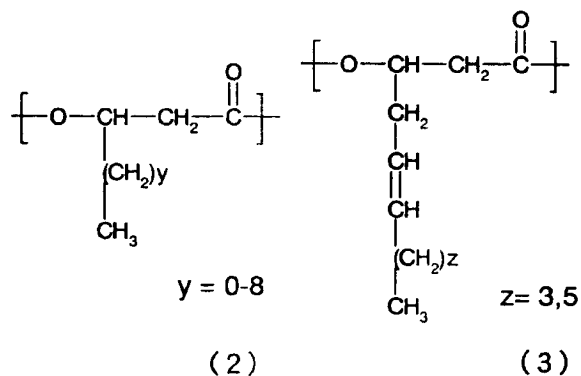
(但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''
 (R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ONa、OK、ハロゲン原子、O
 CH₃、OC₂H₅)」から任意に選択される。
 また、xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【0 0 4 4】

本発明で得られるポリヒドロキシアлкаノエートは、化学式(2)及び(3)
 に示すユニットの少なくとも一方を含むポリヒドロキシアлкаノエートとすること
 ができる。

【0 0 4 5】

【化 4 9】



(y及びzは(1)で示すユニットと独立して化学式中に示した範囲内で任意の一つ
 以上の整数値をとり得る。)

【0 0 4 6】

またさらに、化学式(10)に示す化合物を少なくとも一種類以上含み、かつポリペプトンを含む培地中で微生物を培養する工程(工程1-1)と、これに続く、化学式(10)に示す化合物を少なくとも一種類以上含み、かつ有機酸或いはその塩を含む培地中で、工程1-1で培養された微生物を更に培養する工程(工程2-1)を行なうことを特徴とする、当該ポリヒドロキシアルカノエートの製造方法に関するものである。

【0047】

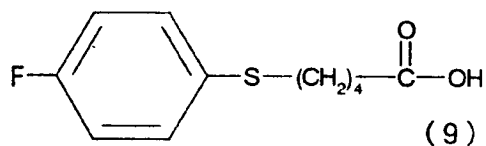
加えて、化学式(10)に示す化合物を少なくとも一種類以上含み、かつ糖類を含む培地中で微生物を培養する工程(工程1-2)と、これに続く、化学式(10)に示す化合物を少なくとも一種類以上含み、また糖類を含む培地中で、工程1-2で培養された微生物を更に培養する工程(工程2-2)を行なうことを特徴とする、当該ポリヒドロキシアルカノエートの製造方法に関するものである。

【0048】

とりわけ、化学式(9)に示す5-(4-フルオロフェニルスルファニル)吉草酸(以下、3HFTP×Vと略す場合もある)を含む培地中で微生物を培養し、化学式(4)に示す3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェニルスルファニル)吉草酸ユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートを生産すること、

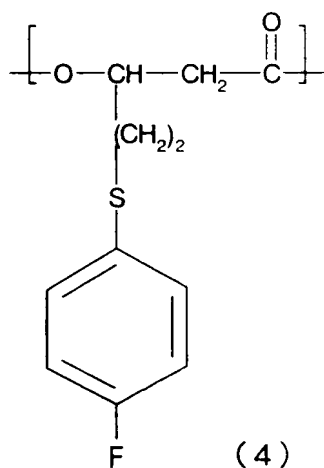
【0049】

【化50】



【0050】

【化 5 1】

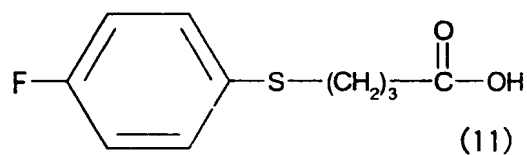


【0 0 5 1】

あるいは、化学式(11)に示す4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]酪酸(以下、3HFTPxBと略す場合もある)を含む培地中で微生物を培養し、化学式(5)に示す3-ヒドロキシ-4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]酪酸ユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエートを生産すること

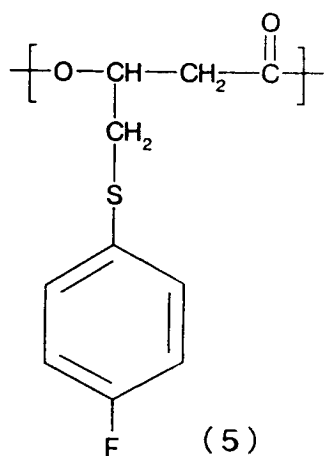
【0 0 5 2】

【化 5 2】



【0 0 5 3】

【化 5 3】



【0 0 5 4】

を特徴とする前記記載のポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法に関するものである。

【0 0 5 5】

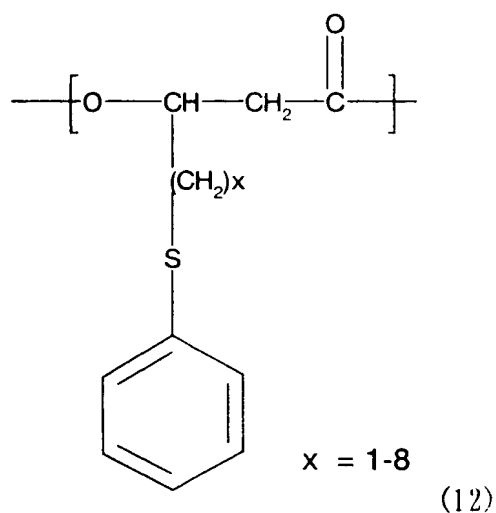
また加えて、前記微生物細胞からポリヒドロキシアлкаノエートを回収する工程を含む前記記載の方法に関するものである。

【0 0 5 6】

本発明はまた、化学式(1)に示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートの中でも特に、化学式(13)に示す3-ヒドロキシ-[(4-スルホフェニル)スルファニル]アルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法において、化学式(12)に示す3-ヒドロキシ-(フェニルスルファニル)アルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートをクロロ硫酸によりスルホン化する工程を有することを特徴とする、化学式(13)に示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法に関するものである。

【0 0 5 7】

【化 5 4】

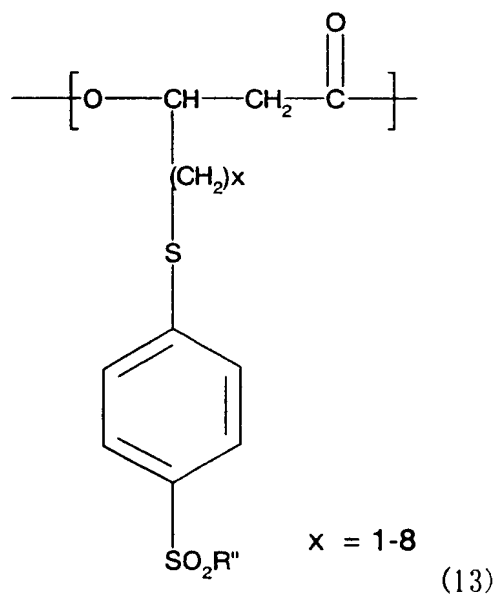


【0 0 5 8】

(xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【0 0 5 9】

【化 5 5】



【0 0 6 0】

(但し、R''は「OH、ONa、OK」から任意に選択される。

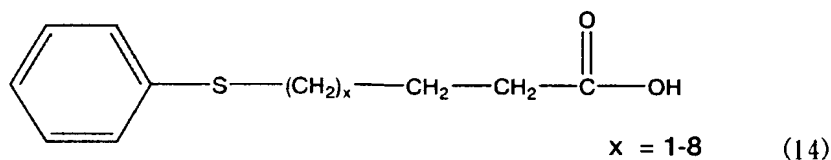
また、xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【 0 0 6 1 】

この場合、化学式(12)に示す 3-ヒドロキシ-(フェニルスルファニル)アルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートは、化学式(14)に示す (フェニルスルファニル)アルカン酸の少なくとも一種類以上を含む培地中で微生物を培養する工程を含む方法で製造することも可能である。

【 0 0 6 2 】

【 化 5 6 】



【 0 0 6 3 】

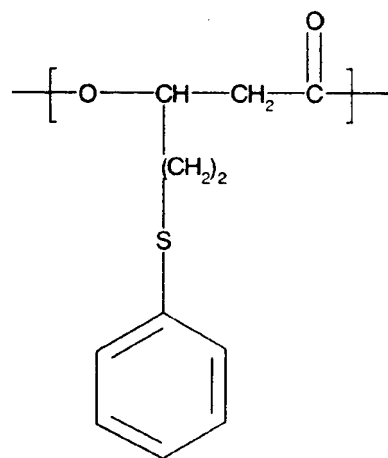
(xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【 0 0 6 4 】

その中でも特に、化学式(15)に示す 3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルファニル)吉草酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートをクロロ硫酸によりスルホン化する工程を有する方法により、化学式(6)に示す、3-ヒドロキシ-5-[(4-スルホフェニル)スルファニル]吉草酸ユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法に関するものである。

【 0 0 6 5 】

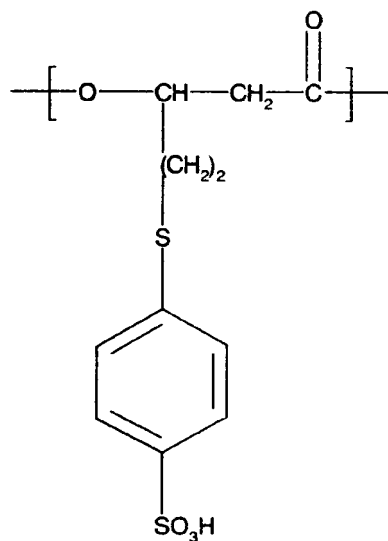
【化 5 7】



(15)

【 0 0 6 6】

【化 5 8】



(6)

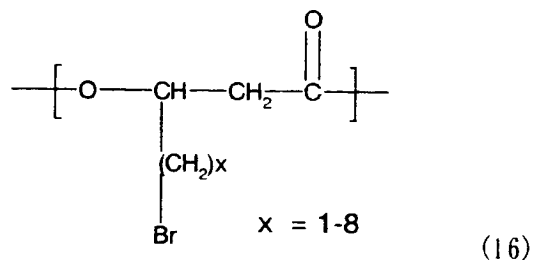
【 0 0 6 7】

本発明はまた、化学式(16)に示す、3-ヒドロキシ- ω -ブロモアルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートと、化学式(17)に示す、置換ベンゼンチオールを反応させる工程を有することを特徴とする、化学式(1)に示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法に関するも

のである。

【0068】

【化59】

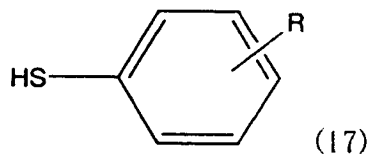


【0069】

(xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【0070】

【化60】



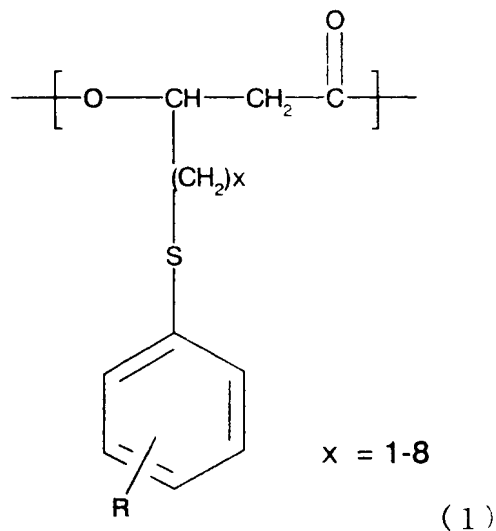
【0071】

(但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」から任意に選択される。)

【0072】

【化 61】



【0073】

(但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」から任意に選択される。

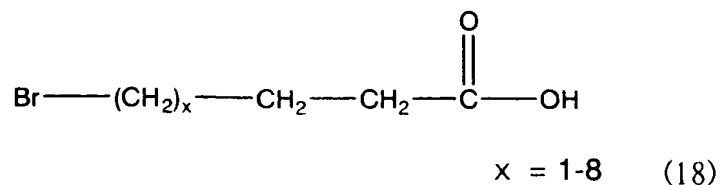
また、xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【0074】

この場合、化学式(16)に示す、3-ヒドロキシ- ω -ブロモアルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートは、化学式(18)に示す ω -ブロモアルカン酸の少なくとも一種類以上を含む培地中で微生物を培養する工程を含む方法で製造することも可能である。

【0075】

【化 6 2】



【0 0 7 6】

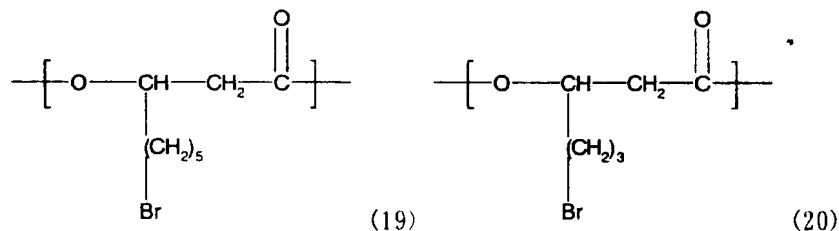
(xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【0 0 7 7】

その中でも特に、化学式(19)に示す、3-ヒドロキシ-8-ブロモオクタン酸ユニット、化学式(20)に示す、3-ヒドロキシ-6-ブロモヘキサン酸ユニットの少なくとも一方を含むポリヒドロキシアルカノエートと、化学式(21)に示す、4-メルカプト安息香酸を反応させる工程を有する方法により、化学式(7)に示す、3-ヒドロキシ-8-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル]オクタン酸ユニット、化学式(8)に示す、3-ヒドロキシ-6-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル]ヘキサン酸ユニットの少なくとも一方を分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートのポリヒドロキシアルカノエートの製造方法に関するものである。

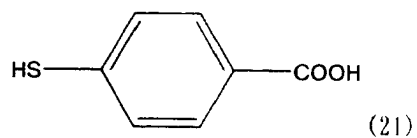
【0 0 7 8】

【化 6 3】



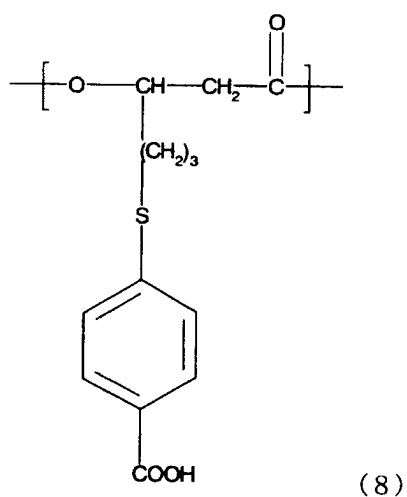
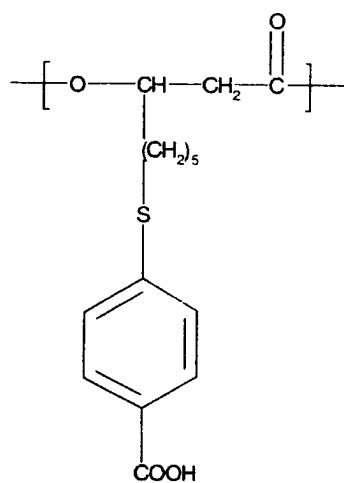
【0 0 7 9】

【化 6 4】



【0 0 8 0】

【化 6 5】

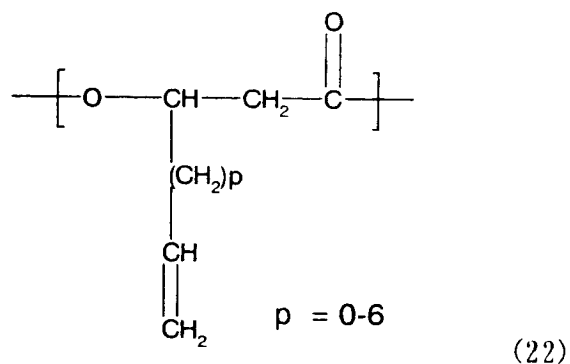


【0 0 8 1】

本発明はまた、化学式(22)に示す、3-ヒドロキシ- ω -アルケン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートと、化学式(17)に示す、置換ベンゼンチオールを反応させる工程を有することを特徴とする、化学式(23)に示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法に関するものである。

【0 0 8 2】

【化 6 6】

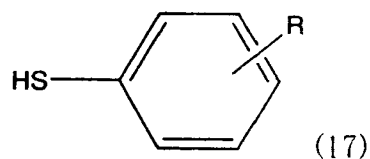


【 0 0 8 3 】

(pは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【 0 0 8 4 】

【化 6 7】



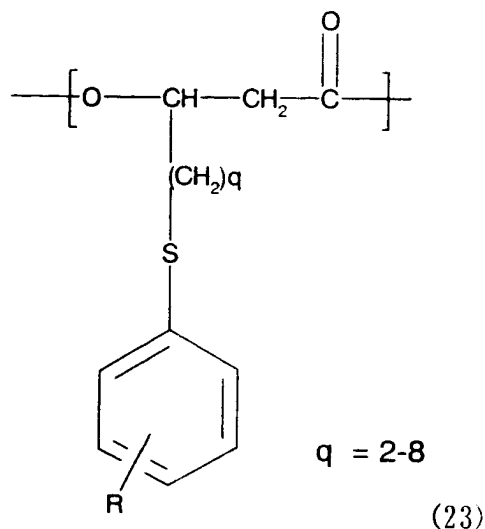
【 0 0 8 5 】

(但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅；R'':OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」から任意に選択される。)

【 0 0 8 6 】

【化 68】



【0087】

(但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」から任意に選択される。

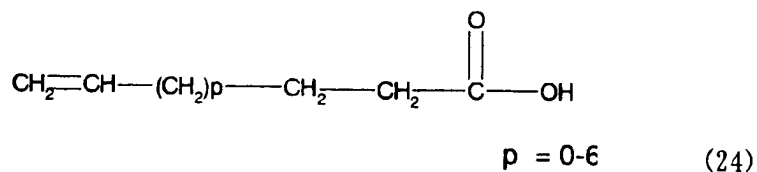
また、qは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【0088】

この場合、化学式(22)に示す、3-ヒドロキシ- ω -アルケン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートは、化学式(24)に示す ω -アルケン酸の少なくとも一種類以上を含む培地中で微生物を培養する工程を含む方法で製造することも可能である。

【0089】

【化 69】



【 0 0 9 0 】

(pは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【 0 0 9 1 】

本発明の新規なポリヒドロキシアルカノエートは、モノマーユニットとなる3-ヒドロキシアルカン酸自体が芳香環及びチオエーテル(スルファニル)構造を有する新規なものであり、この構造により高い反応性を有している。また、芳香環部位の置換基が様々な物理化学的性質に寄与している。このポリヒドロキシアルカノエートは、PHA生産能力を有する微生物により、対応する[(置換フェニル)スルファニル]アルカン酸と増殖用炭素源を含んだ培地から直接生産せしめることによって、或いは3-ヒドロキシ-(フェニルスルファニル)アルカン酸の芳香環部分を化学的に修飾することによって、或いは3-ヒドロキシ- ω -ブromoアルカン酸または3-ヒドロキシ- ω -アルケン酸と置換ベンゼンチオールを反応させることによって得られるものである。

【 0 0 9 2 】

本発明の新規なポリヒドロキシアルカノエートは数平均分子量として 1,000～500,000 の範囲の分子量を有するものである。

【 0 0 9 3 】

【発明の実施の形態】

(微生物)

本発明の方法で用いる微生物は、化学式(10)に示す化合物を含む培地中で培養することにより化学式(1)に示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートを生産しうる微生物であれば如何なる微生物であってもよいが、その一例としては、シュードモナス(*Pseudomonas*)属に属する微生物が挙げられる。さらに詳しくは、微生物がシュードモナス・チコリアイ YN 2 株(*Pseudomonas cichorii* YN 2 ; FERM BP-7375)、シュードモナス・チコリアイ H45 株(*Pseudomonas cichorii* H45、FERM BP-7374)、シュードモナス・ジェッセニイ P161株(*Pseudomonas jessenii* P161、FERM BP-7376)、シュードモナス・プチダ P91株(*Pseudomonas putida* P91、FERM BP-7373)が挙げられる。これら4種の微生物は独立行政法人 産業技術総合研究所(旧

経済産業省 工業技術院)生命工学工業技術研究所に寄託されており、特願平11-371863号に記載されている微生物である。

【 0 0 9 4 】

以下に Y N 2 株、H45株、P 161株及び P 91株についての詳細を示す。

＜ Y N 2 株の菌学的性質＞

(1)形態学的性質

細胞の形と大きさ : 桿菌、 $0.8\mu\text{m} \times 1.5 \sim 2.0\mu\text{m}$

細胞の多形性 : なし

運動性 : あり

胞子形成 : なし

グラム染色性 : 陰性

コロニー形状 : 円形、全縁なめらか、低凸状、
表層なめらか、光沢、半透明

(2)生理学的性質

カタラーゼ : 陽性

オキシダーゼ : 陽性

O/F 試験 : 酸化型(非発酵性)

硝酸塩の還元 : 陰性

インドールの生成 : 陽性

ブドウ糖酸性化 : 陰性

アルギニンジヒドロラーゼ : 陰性

ウレアーゼ : 陰性

エスクリン加水分解 : 陰性

ゼラチン加水分解 : 陰性

β -ガラクトシダーゼ : 陰性

King's B 寒天での蛍光色素産生 : 陽性

4 % NaCl での生育 : 陽性(弱い生育)

ポリ- β -ヒドロキシ酪酸の蓄積 : 陰性(*)

Tween 80 の加水分解 : 陽性

* nutrient agar培養コロニーをズダンブラックで染色することで判定。

(3) 基質資化能

ブドウ糖	: 陽性
L-アラビノース	: 陽性
D-マンノース	: 陰性
D-マンニトール	: 陰性
N-アセチル-D-グルコサミン	: 陰性
マルトース	: 陰性
グルコン酸カリウム	: 陽性
n-カプリン酸	: 陽性
アジピン酸	: 陰性
dl-リンゴ酸	: 陽性
クエン酸ナトリウム	: 陽性
酢酸フェニル	: 陽性

【 0 0 9 5 】

< H45株の菌学的性質 >

(1) 形態学的性質

細胞の形と大きさ	: 桿菌、 $0.8\mu\text{m} \times 1.0 \sim 1.2\mu\text{m}$
細胞の多形性	: なし
運動性	: あり
胞子形成	: なし
グラム染色性	: 陰性
コロニー形状	: 円形、全縁なめらか、低凸状、 表層なめらか、光沢、クリーム色

(2) 生理学的性質

カタラーゼ	: 陽性
オキシダーゼ	: 陽性
O/F 試験	: 酸化型
硝酸塩の還元	: 陰性

インドールの生成	:陰性
ブドウ糖酸性化	:陰性
アルギニンジヒドロラーゼ	:陰性
ウレアーゼ	:陰性
エスクリン加水分解	:陰性
ゼラチン加水分解	:陰性
β -ガラクトシダーゼ	:陰性
King's B 寒天での蛍光色素産生	:陽性
4% NaCl での生育	:陰性
ポリ- β -ヒドロキシ酪酸の蓄積	:陰性

(3) 基質資化能

ブドウ糖	:陽性
L-アラビノース	:陰性
D-マンノース	:陽性
D-マンニトール	:陽性
N-アセチル-D-グルコサミン	:陽性
マルトース	:陰性
グルコン酸カリウム	:陽性
n-カプリン酸	:陽性
アジピン酸	:陰性
dl-リンゴ酸	:陽性
クエン酸ナトリウム	:陽性
酢酸フェニル	:陽性

【0096】

< P161株の菌学的性質 >

(1) 形態学的性質

細胞の形と大きさ	:球状、 $\phi 0.6 \mu\text{m}$ 桿状、 $0.6 \mu\text{m} \times 1.5 \sim 2.0 \mu\text{m}$
細胞の多形性	:あり(伸長型)

運動性	:あり
孢子形成	:なし
グラム染色性	:陰性
コロニー形状	:円形、全縁なめらか、低凸状、 表層なめらか、淡黄色

(2) 生理学的性質

カタラーゼ	:陽性
オキシダーゼ	:陽性
O/F 試験	:酸化型
硝酸塩の還元	:陽性
インドールの生成	:陰性
ブドウ糖酸性化	:陰性
アルギニンジヒドロラーゼ	:陽性
ウレアーゼ	:陰性
エスクリン加水分解	:陰性
ゼラチン加水分解	:陰性
β -ガラクトシダーゼ	:陰性
King's B 寒天での蛍光色素産生	:陽性

(3) 基質資化能

ブドウ糖	:陽性
L-アラビノース	:陽性
D-マンノース	:陽性
D-マンニトール	:陽性
N-アセチル-D-グルコサミン	:陽性
マルトース	:陰性
グルコン酸カリウム	:陽性
n-カプリン酸	:陽性
アジピン酸	:陰性
dl-リンゴ酸	:陽性

クエン酸ナトリウム : 陽性

酢酸フェニル : 陽性

【 0 0 9 7 】

< P 91 株の菌学的性質 >

形態学的性質

細胞の形と大きさ : 桿菌、 $0.6\mu\text{m} \times 1.5\mu\text{m}$

細胞の多形性 : なし

運動性 : あり

孢子形成 : なし

グラム染色性 : 陰性

コロニー形状 : 円形、全縁なめらか、低凸状、
表層なめらか、光沢、クリーム色

生理学的性質

カタラーゼ : 陽性

オキシダーゼ : 陽性

O/F 試験 : 酸化型

硝酸塩の還元 : 陰性

インドールの生成 : 陰性

ブドウ糖酸性化 : 陰性

アルギニンジヒドロラーゼ : 陽性

ウレアーゼ : 陰性

エスクリン加水分解 : 陰性

ゼラチン加水分解 : 陰性

β -ガラクトシダーゼ : 陰性

King's B 寒天での蛍光色素産生 : 陽性

基質資化能

ブドウ糖 : 陽性

L-アラビノース : 陰性

D-マンノース : 陰性

D-マンニトール	:陰性
N-アセチル-D-グルコサミン	:陰性
マルトース	:陰性
グルコン酸カリウム	:陽性
n-カプリン酸	:陽性
アジピン酸	:陰性
dl-リンゴ酸	:陽性
クエン酸ナトリウム	:陽性
酢酸フェニル	:陽性

【 0 0 9 8 】

(培養工程)

本発明にかかる P H A の製造方法に用いる微生物の通常の培養、例えば、保存菌株の作成、P H A の生産に必要なとされる菌数や活性状態を確保するための増殖などには、用いる微生物の増殖に必要な成分を含有する培地を適宜選択して用いる。例えば、微生物の生育や生存に悪影響を及ぼすものでない限り、一般的な天然培地(肉汁培地、酵母エキスなど)や、栄養源を添加した合成培地など、いかなる種類の培地をも用いることができる。温度、通気、攪拌などの培養条件は、用いる微生物に応じて適宜選択する。

【 0 0 9 9 】

前記したような P H A 生産微生物を用いて、目的とするポリヒドロキシアルカノエートを製造するためには、P H A 生産用の原料として、該モノマーユニットに対応する、上記化学式(10)に示す化合物と、微生物の増殖用炭素源とを少なくとも含んだ無機培地などを用いることができる。上記化学式(10)に示す化合物は、培地あたり 0.01% から 1 % (w/v)、更に好ましくは 0.02% から 0.2% の割合で含有していることが望ましい。水溶性は必ずしも良好ではないが、本発明に示す微生物を用いれば、懸濁された状態であっても何ら問題は無い。また、場合によっては 1-ヘキサデセンや n-ヘキサデカンのような溶媒に溶解或いは懸濁された形で培地中に含有されることも可能である。この場合、該溶媒の濃度は培地溶液に対して 3 % 以下にすることが必要である。

【0100】

増殖用基質としては、酵母エキスやポリペプトン、肉エキスといった栄養素を用いることが可能であり、更に、糖類、TCA回路中の中間体として生じる有機酸、或いはTCA回路から更に1段階ないしは2段階の生化学反応により得られる有機酸或いはその塩、アミノ酸或いはその塩、炭素数4から12の直鎖アルカン酸或いはその塩等、から用いる菌株に対する基質としての有用性で適宜選択することができる。

【0101】

これらのうち、糖類としては、グリセロアルデヒド、エリスロース、アラビノース、キシロース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトースといったアルドース、

グリセロール、エリスリトール、キシリトール等のアルジトール、

グルコン酸等のアルドン酸、

グルクロン酸、ガラクツロン酸等のウロン酸、

マルトース、スクロース、ラクトースといった二糖等

から選ばれる1つ以上の化合物が好適に利用できる。

【0102】

また、有機酸或いはその塩としては、ピルビン酸、リンゴ酸、乳酸、クエン酸、コハク酸、オキサロ酢酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、フマル酸或いはその塩から選ばれる1つ以上の化合物が好適に利用できる。

【0103】

また、アミノ酸或いはその塩としては、グルタミン酸、アスパラギン酸或いはその塩から選ばれる1つ以上の化合物が好適に利用できる。

【0104】

これらの中では、ポリペプトンや糖類を用いるのが好ましく、また糖類の中ではグルコース、フルクトース、マンノースからなる群から選択される少なくとも一つであることがより好ましい。これらの基質は通常培地あたり0.1%から5% (w/v)、更に好ましくは0.2%から2%の割合で含有していることが望ましい。

【0105】

微生物に P H A を生産・蓄積させる方法としては、一旦十分に増殖させて後に、塩化アンモニウムのような窒素源を制限した培地へ菌体を移し、目的ユニットの基質となる化合物を加えた状態で更に培養すると生産性が向上する場合がある。具体的には、前記の工程を複数段接続した多段方式の採用が挙げられる。

【 0 1 0 6 】

例えば、化学式(10)に示す化合物、及びポリペプトンを含む培地中で微生物を培養する工程(工程 1-1)を対数増殖後期から定常期の時点まで続け、菌体を遠心分離等で回収したのち、これに続く、化学式(10)に示す化合物と有機酸或いはその塩とを含む培地中で、工程 1-1 で培養された微生物を更に培養する工程(工程 2-1)を行なう方法、

あるいは、化学式(10)に示す化合物、及び糖類を含む培地中で微生物を培養する工程(工程 1-2)を対数増殖後期から定常期の時点まで続け、菌体を遠心分離等で回収したのち、これに続く、化学式(10)に示す化合物と糖類とを含む培地中で、工程 1-2 で培養された微生物を更に培養する工程(工程 2-2)を行なう方法等である。

【 0 1 0 7 】

これらの培養方法の場合、2 段階目の培養(工程 2-1 及び 2-2)に用いる培地は、窒素源となる化合物を著しく制限するか、或いは含有しない状態にすることにより、該ポリヒドロキシアルカノエートの生産量を増大せしめることが可能な場合もある。

【 0 1 0 8 】

培養温度としては上記の菌株が良好に増殖可能な温度であれば良く、例えば 15~40℃、好ましくは 20~35℃、更に好ましくは 20℃ から 30℃ 程度が適当である。

【 0 1 0 9 】

培養は液体培養、固体培養等該微生物が増殖し、P H A を生産する培養方法ならいかなる培養方法でも用いることができる。さらに、バッチ培養、フェドバッチ培養、半連続培養、連続培養等の種類も問わない。液体バッチ培養の形態としては、振とうフラスコによって振とうさせて酸素を供給する方法、ジャーファー

メンターによる攪拌通気方式の酸素供給方法がある。

【0 1 1 0】

上記の培養方法に用いる無機培地としては、リン源(例えば、リン酸塩など)、窒素源(例えば、アンモニウム塩、硝酸塩など)等、当該微生物の増殖に必要な成分を含んでいるものであればいかなるものでも良く、例えば、MSB培地、M9培地等を挙げることができる。

【0 1 1 1】

本発明の一方法に用いた無機塩培地(M9培地)の組成を以下に示す。

【0 1 1 2】

[M9培地]

Na_2HPO_4 6.2g

KH_2PO_4 3.0g

NaCl 0.5g

NH_4Cl 1.0g

(培地1リットル中、pH 7.0)

【0 1 1 3】

更に、良好な増殖及びPHAの生産のためには、上記の無機塩培地に以下に示す微量成分溶液を 0.3%(v/v)程度添加する必要がある。

【0 1 1 4】

[微量成分溶液]

ニトリロ三酢酸: 1.5g ; MgSO_4 : 3.0g ;

MnSO_4 : 0.5g ; NaCl : 1.0g ; FeSO_4 : 0.1g ;

CaCl_2 : 0.1g ; CoCl_2 : 0.1g ; ZnSO_4 : 0.1g ;

CuSO_4 : 0.1g ; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$: 0.1g ;

H_3BO_3 : 0.1g ; Na_2MoO_4 : 0.1g ; NiCl_2 : 0.1g

(溶液1リットル中)

【0 1 1 5】

(分離工程)

本発明において、上記のように培養された微生物細胞から目的のPHAを分離

する方法としては、通常行なわれている方法を適用することができる。例えば、クロロホルム、ジクロロメタン、アセトンなどの有機溶媒による抽出が最も簡便ではあるが、それ以外にジオキサン、テトラヒドロフラン、アセトニトリルが用いられる場合もある。また、有機溶媒が使用しにくい環境中においては、S D S等の界面活性剤による処理、リゾチーム等の酵素による処理、E D T A等の薬剤による処理によって、或いは超音波破碎法、ホモジナイザー法、圧力破碎法、ビーズ衝撃法、摩砕法、搗潰法、凍結融解法のいずれかの方法を用いて微生物細胞を物理的に破碎することによって、P H A以外の菌体成分を除去して、P H Aを回収する方法を用いることもできる。

【 0 1 1 6 】

なお、本発明の微生物の培養、本発明の微生物によるP H Aの生産と菌体への蓄積、並びに、本発明における菌体からのP H Aの回収は、上記の方法に限定されるものではない。

【 0 1 1 7 】

また、本発明のP H Aの製造方法として、その前駆体となるP H Aを化学的に処理する方法がある。以下その方法について述べる。

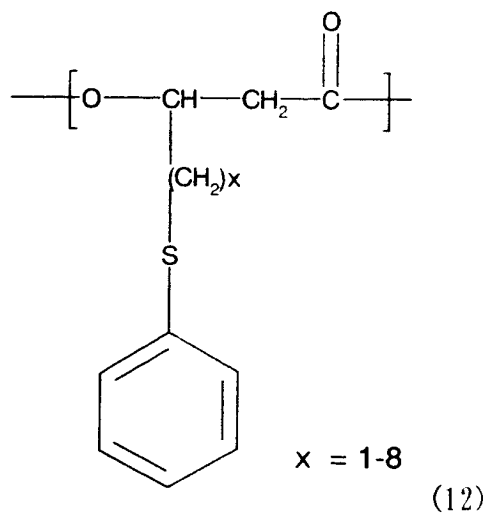
【 0 1 1 8 】

(スルホン化法)

本発明のP H Aのうち、特に化学式(13)に示す3-ヒドロキシ-[(4-スルホフェニル)スルファニル]アルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートを製造する方法としては、化学式(12)に示す3-ヒドロキシ-(フェニルスルファニル)アルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートを、クロロ硫酸によりスルホン化する工程を用いる方法がある。

【 0 1 1 9 】

【化 7 0】

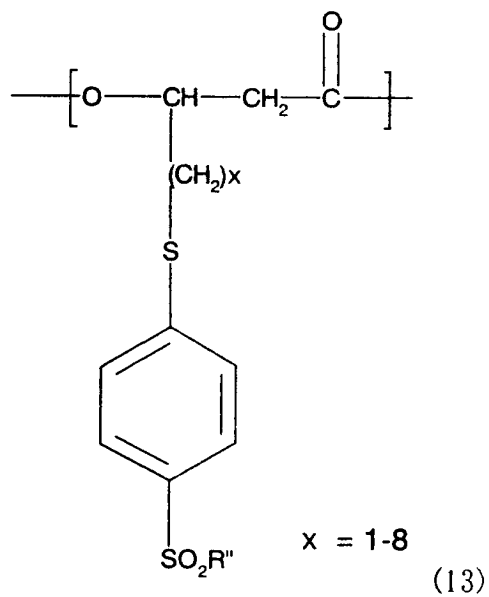


【 0 1 2 0 】

(xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【 0 1 2 1 】

【化 7 1】



【 0 1 2 2 】

(但し、R"は「OH、ONa、OK」から任意に選択される。

また、xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【0123】

具体的には、化学式(12)に示す3-ヒドロキシ-(フェニルスルファニル)アルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートをクロロホルム等の溶媒に溶解し、氷冷中でクロロ硫酸を滴下することにより3-ヒドロキシ-(フェニルスルファニル)アルカン酸ユニットの芳香環4位(パラ位)を選択的にスルホン化することができる。更に反応が進めば、2位或いは6位(オルト位)にもスルホン基が導入される可能性がある。

【0124】

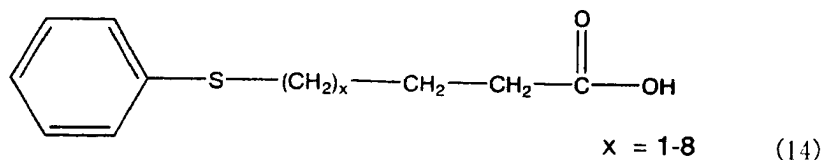
この場合、クロロ硫酸の滴下量としては、ポリマー1gあたり0.5mLから5mL程度が好ましい。反応温度は、前記したように-20から20℃程度で行うことが好ましく、-10から10℃程度で行うことがより好ましい。

【0125】

本法において、化学式(12)に示す3-ヒドロキシ-(フェニルスルファニル)アルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートは、化学式(14)に示す(フェニルスルファニル)アルカン酸の少なくとも一種以上を含む培地中で微生物を培養する工程を含む方法で製造することも可能である。

【0126】

【化72】



【0127】

(xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【0128】

本法で用いる微生物、微生物の培養、微生物によるPHAの生産と菌体への蓄

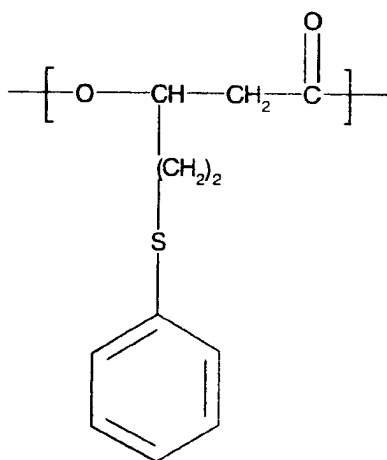
積、並びに、菌体からの P H A の回収方法は、上記の方法と同様である。

【 0 1 2 9 】

この様な方法で、例えば、化学式(15)に示す 3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルファニル)吉草酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートから、化学式(6)に示す、3-ヒドロキシ-5-[(4-スルホフェニル)スルファニル]吉草酸ユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエートを製造することが可能である。

【 0 1 3 0 】

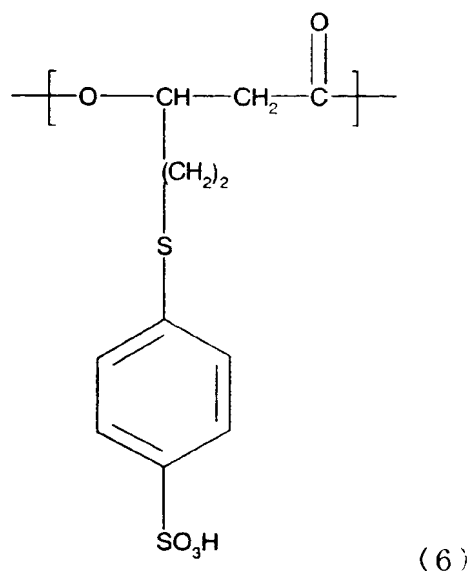
【化 7 3】



(15)

【 0 1 3 1 】

【化 7 4】



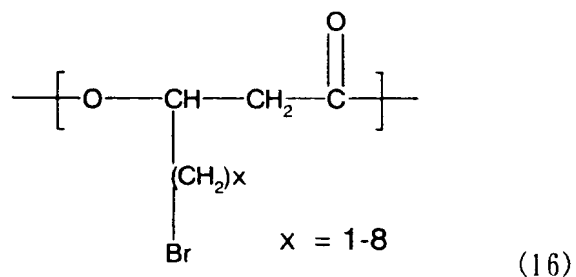
【0 1 3 2】

(ブロモ基、ビニル基とベンゼンチオールとの反応)

化学式(1)に示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法として、化学式(16)に示す、3-ヒドロキシ- ω -ブromoアルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートと、化学式(17)に示す、置換ベンゼンチオールを反応させる工程を含む方法がある。

【0 1 3 3】

【化 7 5】

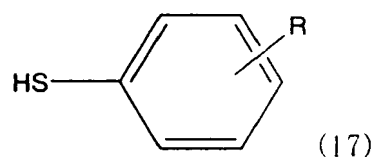


【0 1 3 4】

(xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【0135】

【化76】

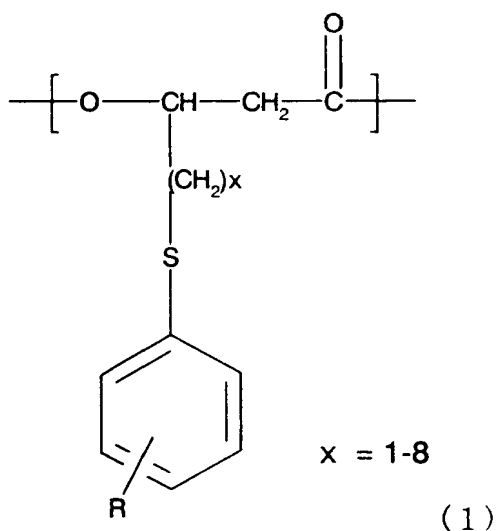


【0136】

(但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''
(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ONa、OK、ハロゲン原子、O
CH₃、OC₂H₅)」から任意に選択される。)

【0137】

【化77】



【0138】

(但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''
(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ONa、OK、ハロゲン原子、O
CH₃、OC₂H₅)」から任意に選択される。

また、xは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【0 1 3 9】

反応は塩基性の条件下で行うことが好ましく、より詳細には、化学式(16)に示す、3-ヒドロキシ- ω -ブロモアルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの溶液をアセトンに溶解し、炭酸カリウムの存在下、より好ましくは更にヨウ化ナトリウムの共存下で化学式(17)に示す、置換ベンゼンチオールを反応させる方法、或いは化学式(16)に示す、3-ヒドロキシ- ω -ブロモアルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの溶液をジメチルホルムアミド(以下DMFと略す場合もある)に溶解し、ジエチルアミンの存在下で化学式(17)に示す、置換ベンゼンチオールを反応させる方法がある。

【0 1 4 0】

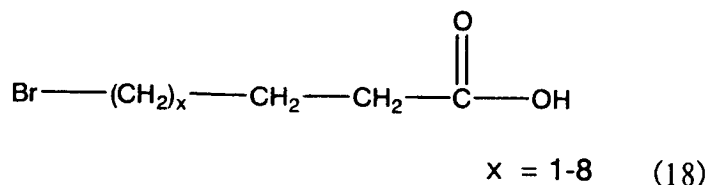
この場合、反応させる置換ベンゼンチオールの量は3-ヒドロキシ- ω -ブロモアルカン酸ユニットと等モル量から2倍モル量相当が適当である。反応温度は15℃から30℃程度が好ましい。

【0 1 4 1】

本法において、化学式(16)に示す、3-ヒドロキシ- ω -ブロモアルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートは、化学式(18)に示す ω -ブロモアルカン酸の少なくとも一種類以上を含む培地中で微生物を培養する工程を含む方法で製造することも可能である。

【0 1 4 2】

【化 7 8】



【0 1 4 3】

(x は化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【0 1 4 4】

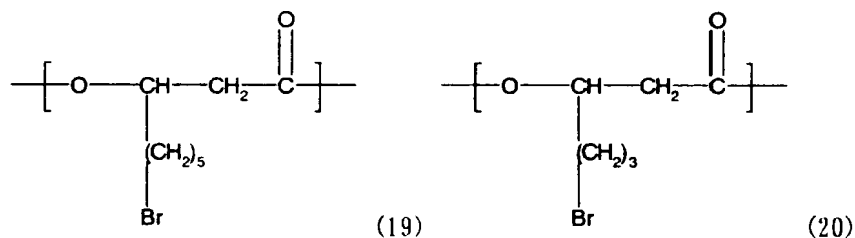
本法で用いる微生物、微生物の培養、微生物による P H A の生産と菌体への蓄積、並びに、菌体からの P H A の回収方法は、上記の方法と同様である。

【 0 1 4 5 】

この様な方法で、例えば、化学式(19)に示す、3-ヒドロキシー 8-ブロモオクタン酸ユニット、化学式(20)に示す、3-ヒドロキシー 6-ブロモヘキサン酸ユニットの少なくとも一方を含むポリヒドロキシアルカノエートと、化学式(21)に示す、4-メルカプト安息香酸から、化学式(7)に示す、3-ヒドロキシー 8-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル]オクタン酸ユニット、化学式(8)に示す、3-ヒドロキシー 6-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル]ヘキサン酸ユニットの少なくとも一方を分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの製造が可能となる。

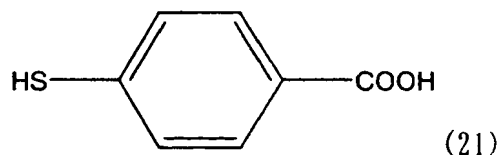
【 0 1 4 6 】

【化 7 9】



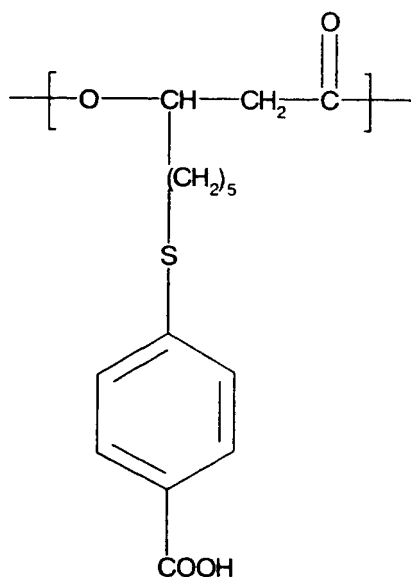
【 0 1 4 7 】

【化 8 0】

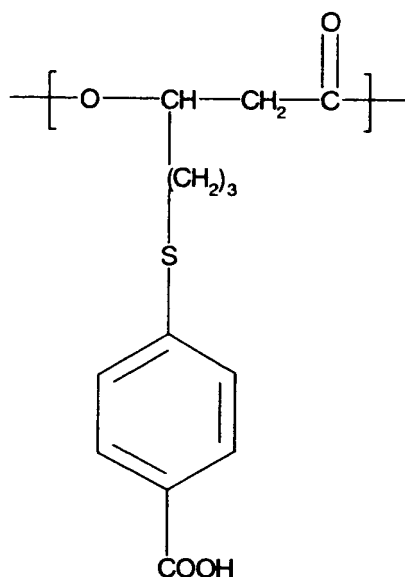


【 0 1 4 8 】

【化 8 1】



(7)



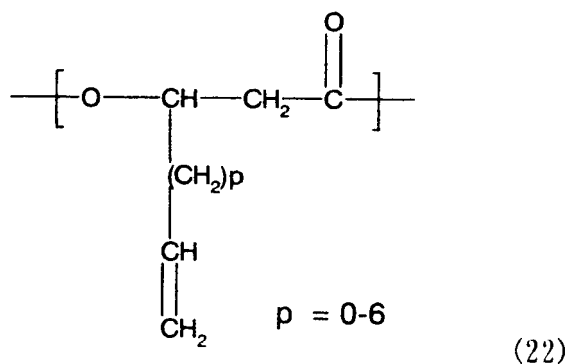
(8)

【0149】

更に、化学式(1)に示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートのうち、化学式(23)に示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法として、化学式(22)に示す、3-ヒドロキシ- ω -アルケン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートと、化学式(17)に示す、置換ベンゼンチオールを反応させる工程を含む方法がある。

【0150】

【化 8 2】



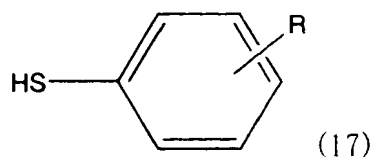
(22)

【0151】

(pは化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【0152】

【化83】



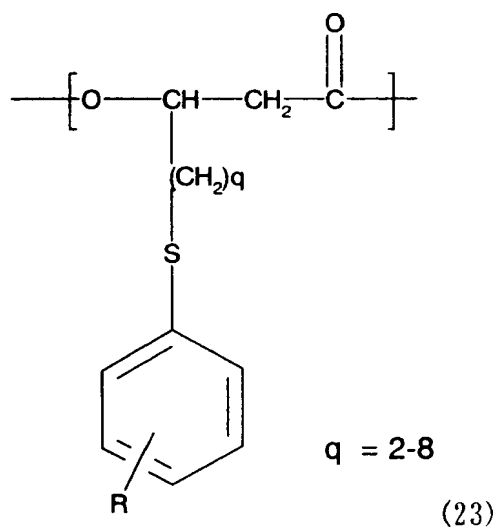
【0153】

(但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」から任意に選択される。)

【0154】

【化84】



【0155】

(但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ONa、OK、ハロゲン原子、O

CH_3 、 OC_2H_5)」から任意に選択される。

また、 q は化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【0156】

本反応の進行には、過酸化ジアシル化合物のような遊離基重合開始剤が必要であり、より詳細には、化学式(22)に示す、3-ヒドロキシ- ω -アルケン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートをクロロホルム等の溶媒に溶解し、過酸化ベンゾイル(以下BPOと略する場合もある)の存在下で化学式(17)に示す、置換ベンゼンチオールを反応させる方法がある。

【0157】

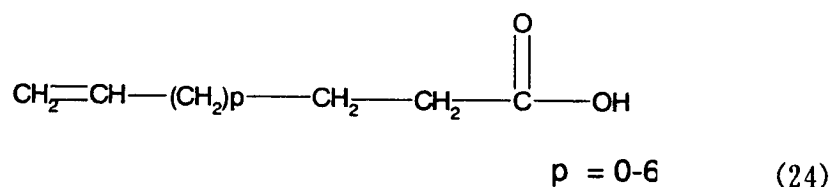
この場合、反応させる置換ベンゼンチオールの量は3-ヒドロキシ- ω -ブromoアルカン酸ユニットと等モル量から2倍モル量相当が適当である。反応温度は溶媒が還流される温度、例えばクロロホルムの場合では70℃程度が好ましい。

【0158】

本法において、化学式(22)に示す、3-ヒドロキシ- ω -アルケン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートは、化学式(24)に示す ω -アルケン酸の少なくとも一種類以上を含む培地中で微生物を培養する工程を含む方法で製造することも可能である。

【0159】

【化85】



【0160】

(p は化学式中に示した範囲で任意の整数値を一つ以上とり得る。)

【0161】

本法で用いる微生物、微生物の培養、微生物によるPHAの生産と菌体への蓄

積、並びに、菌体からの P H A の回収方法は、上記の方法と同様である。

【 0 1 6 2 】

【実施例】

以下に実施例を示す。なお、以下における「%」は特に標記した以外は重量基準である。

【 0 1 6 3 】

〔実施例 1〕 5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル] 吉草酸の合成

四つ口丸底フラスコに、240mLの脱水アセトンを入れ、炭酸カリウム 15.20g(0.11mol)を加え、窒素雰囲気下で攪拌した。この溶液にヨウ化ナトリウム 9.00g(0.06mol)、4-フルオロベンゼンチオール 8.97g(0.07mol)を加えて、室温、窒素雰囲気下で十分攪拌した。更に、5-ブロモ吉草酸エチル 12.55g(0.06mol)を加え、65℃、18時間加熱還流した。

【 0 1 6 4 】

反応終了後、アセトンをロータリーエバポレーターにより留去し、クロロホルムに再溶解し、水を加えて分液し、有機相を無水硫酸マグネシウムにて脱水した後、クロロホルムをロータリーエバポレーターにより留去し、真空ポンプにより乾燥し、粗製の 5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル] 吉草酸エチルを 14.78g(ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、EI法によるGC-MSピーク比 93.55%))を得た。

【 0 1 6 5 】

ここで得られた粗製の 5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル] 吉草酸エチルは、精製せず次の加水分解反応を行なった。

【 0 1 6 6 】

得られたエステル粗製物 14.78g をエタノール-水(1:9(V/V))混合液 300mLに溶解し、10倍mol量の水酸化カリウムを加えて、氷浴下で4時間反応した。

【 0 1 6 7 】

この反応液を 0.1mol/L塩酸水溶液約 2L中に注ぎ、沈殿化させ、沈殿物は濾過することで取り出した。ここで得られた反応物は、真空ポンプにより乾燥し、

粗製の 5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]吉草酸を得た。

【0168】

ここで得られた粗製の 5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]吉草酸は、少量の熱エタノール-ヘキサン溶媒に溶解させ、徐々に冷却して再結晶し、真空ポンプにより乾燥することで目的の化合物である 5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]吉草酸を得た。

【0169】

ここで得られた 5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]吉草酸の収量は、9.02g であった。

【0170】

また、全収率は、5-ブromo吉草酸エチル基準で 65.9% であった。

【0171】

得られた化合物は、以下の条件で NMR 分析を行なった。

<測定機器> FT-NMR: Bruker DPX 400

共鳴周波数: $^1\text{H} = 400\text{MHz}$

<測定機器> 測定核種: ^1H

使用溶媒: CDCl_3

reference: キャピラリ封入 TMS / CDCl_3

測定温度: 室温

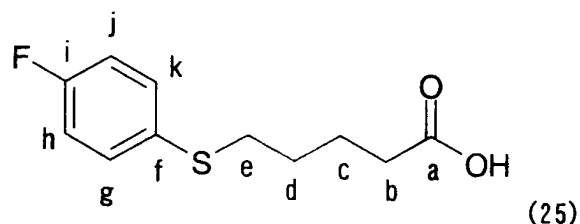
^1H -NMR スペクトルチャートを図 1 に、その同定結果を表 1 にそれぞれ示す。

【0172】

この結果から、所望とする化学式(25)に示す新規化合物である 5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]吉草酸が合成された。

【0173】

【化 8 6】



【0 1 7 4】

【表 1】

表1 ^1H -NMRスペクトル同定結果(図1参照)

Chemical shift (ppm)	積分比	分裂	同定結果
1.65	2	m	d
1.76	2	m	c
2.36	2	t	b
2.87	2	t	e
6.99	2	m	h,j
7.34	2	m	g,k
8.40~12.00	1	br	OH

【0 1 7 5】

以下、5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]吉草酸(以下FTPxVAと略す場合もある)を含む培地でPHA生産菌を培養して3-ヒドロキシ-5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]吉草酸ユニットを主成分とするPHAを製造した例を挙げる(実施例2~7)。

【0 1 7 6】

【実施例2】

ポリペプトン(販売元 和光純薬工業) 0.5%、FTPxVA 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。72時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0 1 7 7】

この凍結乾燥ペレットを 20mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌して P H A を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して P H A を 86mg 得た。

【0178】

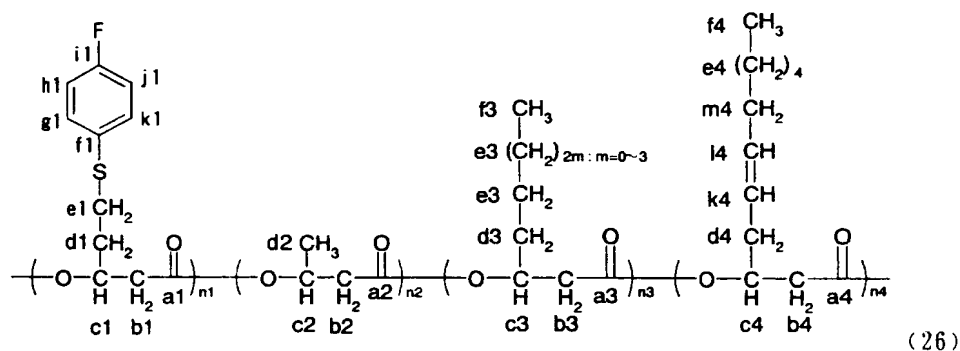
得られた P H A は、実施例 1 と同様の分析条件で N M R 分析を行なった。

【0179】

^1H -NMR スペクトルを図 2 に、その帰属結果を表 2 に示す。表 2 に示す通り、当該 P H A は 3-ヒドロキシ-5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル] 吉草酸をモノマーユニットとして含む、化学式(26)に示す P H A であることが確認された。

【0180】

【化 8 7】



【0181】

【表 2】

表2 ^1H -NMRスペクトル同定結果(図2参照)

Chemical shift (ppm)	積分比	分裂	同定結果
1.86	2	m	dl
2.52	2	m	bl
2.82	2	m	cl
5.26	1	m	cl
6.95	2	m	hl,jl
7.30	2	m	gl,kl

【0 1 8 2】

更に、得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行なった後、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行なった。その結果を表3に示した。

【0 1 8 3】

また、このPHAの分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC; 東ソーHLC-8220、カラム; 東ソーTSK-GEL SuperHM-H、溶媒; クロロホルム、ポリスチレン換算)により評価した結果、 $M_n=95600$ 、 $M_w=291300$ であった。

【0 1 8 4】

【表 3】

表3 シュードモナス・チコリアイ・YN2株によるPHA生産

菌体乾燥重量	960mg/L
ポリマー乾燥重量	430mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	44.8 %
モノマーユニット組成(ピークエリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	14.2 %
3-ヒドロキシヘキサン酸	0.0 %
3-ヒドロキシオクタン酸	0.0 %
3-ヒドロキシデカン酸	0.0 %
3-ヒドロキシドデカン酸	0.0 %
3-ヒドロキシドデセン酸	0.0 %
3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸	85.8 %

【0 1 8 5】

[実施例 3]

ポリペプトン(販売元 和光純薬工業) 0.5%、F T P x V A 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シュードモナス・チコリアイ・H45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。72時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0 1 8 6】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌してP H Aを抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ mのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してP H Aを 44mg得た。

【0 1 8 7】

得られたP H Aは、常法に従ってメタノリシスを行なった後、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(G C -M S、島津Q P -5050、E I法)で分析し、P H Aモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行なった。その結果を表4に示した。表4に示す通り、当該P H Aは3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸をモノマーユニットとして含む、化学式(26)に示すP H Aであることが確認された。

【 0 1 8 8 】

【表 4】

表4 シュードモナス・チコリアイ・H45株によるPHA生産

菌体乾燥重量	710mg/L
ポリマー乾燥重量	220mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	31.0 %
モノマーユニット組成(ピークエリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	7.5 %
3-ヒドロキシヘキサン酸	0.0 %
3-ヒドロキシオクタン酸	0.0 %
3-ヒドロキシデカン酸	0.0 %
3-ヒドロキシドデカン酸	0.0 %
3-ヒドロキシドデセン酸	0.0 %
3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸	92.5 %

【 0 1 8 9 】

[実施例 4]

ポリペプトン(販売元 和光純薬工業) 0.5%、F T P x V A 0.1%とを含むM 9 培地 200 mLに、シュードモナス・チコリアイ・P 161株を植菌し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。72時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【 0 1 9 0 】

この凍結乾燥ペレットを 20 mLクロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌して P H A を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して P H A を 45 mg 得た。

【 0 1 9 1 】

得られた P H A は、常法に従ってメタノリシスを行なった後、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(G C - M S、島津 Q P - 5050、E I 法)で分析し、P H A モノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行なった。その結果を表 5 に示した。表 5 に示す通り、当該 P H A は 3 - ヒドロキシ - 5 - (4 - フルオロチオフェノキシ)吉草酸をモノマーユニットとして含む、化学式(26)に示す P H A であることが確認された。

【0192】

【表5】

表5 シュードモナス・ジェッセニイ・P161株によるPHA生産

菌体乾燥重量	975mg/L
ポリマー乾燥重量	225mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	26.2 %
モノマーユニット組成(ピークエリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0.5 %
3-ヒドロキシヘキサン酸	0.0 %
3-ヒドロキシオクタン酸	0.4 %
3-ヒドロキシデカン酸	0.4 %
3-ヒドロキシドデカン酸	0.0 %
3-ヒドロキシドデセン酸	0.0 %
3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸	98.7 %

【0193】

【実施例5】

D-グルコース 0.5%、FTPxVA 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。72時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース 0.5%、FTPxVA 0.1%を含む、窒素源(NH_4Cl)を含まないM9培地 200mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0194】

この凍結乾燥ペレットを 20mLのクロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを 180mg得た。

【0195】

得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行なった後、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行なった。その結果を表6に示した。表6に示す通り、当該PHAは、3HFTPxVをモノマーユニットとして

含む、化学式(26)に示すPHAであることが確認された。

【0196】

【表6】

表6 シュードモナス・チコリアイ・YN2株によるPHA生産

菌体乾燥重量	1630 mg/L
ポリマー乾燥重量	900 mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	55.2 %
モノマーユニット組成(ピークエリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0.5 %
3-ヒドロキシヘキサン酸	0.8 %
3-ヒドロキシオクタン酸	6.6 %
3-ヒドロキシデカン酸	11.8 %
3-ヒドロキシドデカン酸	3.7 %
3-ヒドロキシドデセン酸	6.5 %
3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフエノキシ)吉草酸	70.1 %

【0197】

【実施例6】

D-グルコース 0.5%、FTP×VA 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シュードモナス・チコリアイ・H45株を植菌し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。72時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース 0.5%、FTP×VA 0.1%を含む、窒素源(NH₄Cl)を含まないM9培地 200mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0198】

この凍結乾燥ペレットを 20mLのクロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径 0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを 169mg 得た。

【0199】

得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行なった後、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行なった。その結果を表7に示し

た。表 7 に示す通り、当該 P H A は、3 H F T P x V をモノマーユニットとして含む、化学式 (26) に示す P H A であることが確認された。

【 0 2 0 0 】

【表 7】

表 7 シュードモナス・チコリアイ・H45 株による P H A 生産

菌体乾燥重量	1445mg/L
ポリマー乾燥重量	840mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	58.1 %
モノマーユニット組成 (ピークエリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	10.6 %
3-ヒドロキシヘキサン酸	0.7 %
3-ヒドロキシオクタン酸	7.7 %
3-ヒドロキシデカン酸	14.9 %
3-ヒドロキシドデカン酸	3.8 %
3-ヒドロキシドデセン酸	5.0 %
3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフェノキシ) 吉草酸	57.3 %

【 0 2 0 1 】

【実施例 7】

D-グルコース 0.5%、F T P x V A 0.1% とを含む M 9 培地 200mL に、シュードモナス・チコリアイ・P 161 株を植菌し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。72 時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース 0.5%、F T P x V A 0.1% を含む、窒素源 (N H₄ C l) を含まない M 9 培地 200mL に再懸濁し、更に、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【 0 2 0 2 】

この凍結乾燥ペレットを 20mL のクロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して P H A を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して P H A を 143mg 得た。

【 0 2 0 3 】

得られた P H A は、常法に従ってメタノリシスを行なった後、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置 (G C - M S、島津 Q P - 5050、E I 法) で分析し、P H A モ

ノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行なった。その結果を表8に示した。表8に示す通り、当該PHAは、3HFTP×Vをモノマーユニットとして含む、化学式(26)に示すPHAであることが確認された。

【0204】

【表8】

表8 シュードモナス・ジェッセニイ・PI61株によるPHA生産

菌体乾燥重量	1105mg/L
ポリマー乾燥重量	715mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	64.7 %
モノマーユニット組成(ピークエリア比)	
3-ヒドロキシ 酪酸	0.0 %
3-ヒドロキシ ヘキサン酸	0.7 %
3-ヒドロキシオクタン酸	5.3 %
3-ヒドロキシデカン酸	12.2 %
3-ヒドロキシドデカン酸	2.9 %
3-ヒドロキシドデセン酸	3.8 %
3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフェノキシ) 吉草酸	75.1 %

【0205】

次に、4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]酪酸(以下FTP×BAと略する場合もある)を含む培地でPHA生産菌を培養して3-ヒドロキシ-4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]酪酸ユニットを主成分とするPHAを製造した例を挙げる(実施例8～18)。

【0206】

【実施例8】

D-グルコース 0.5%、FTP×BA 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。96時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース 0.5%、FTP×BA 0.1%を含む、窒素源(NH₄Cl)を含まないM9培地 200 mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。72時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0207】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌し

て P H A を抽出した。抽出液を孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して P H A を 64mg 得た。

【 0 2 0 8 】

得られた P H A は、以下の条件で N M R 分析を行なった。

<測定機器> F T - N M R : B r u k e r D P X 400

共鳴周波数: $^1\text{H} = 400\text{MHz}$ 、 $^{13}\text{C} = 100\text{MHz}$

<測定機器> 測定核種: ^1H 、 ^{13}C

使用溶媒: CDCl_3

reference: キャピラリー封入 T M S / CDCl_3

測定温度: 室温

^1H -N M R、 ^{13}C -N M R スペクトルチャートをそれぞれ図 4、図 5 に、その同定結果を表 9、表 10 にそれぞれ示す。

【 0 2 0 9 】

【表 9】

表 9 ^1H -N M R スペクトル同定結果

Chemical shift (ppm)	積分比	分裂	同定結果
2.59	2	m	c1
3.03	2	m	b1
5.22	2	quint	d1
6.96	2	m	g1,i1
7.35	2	m	f1,j1

【 0 2 1 0 】

【表 1 0】

表10 ^{13}C -NMRスペクトル同定結果

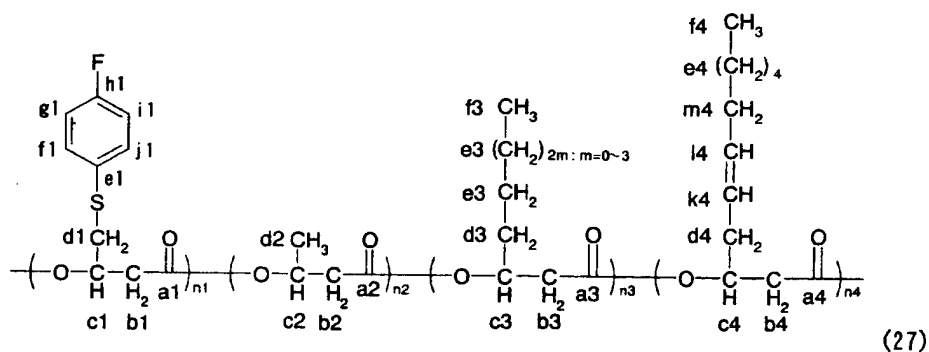
Chemical shift (ppm)	分裂	同定結果
37.4	s	b1 or c1
38.0	s	b1 or c1
69.4	s	d1
116.0 & 116.3	d	g1,i1
129.8 & 129.8	d	e1
132.7 & 132.8	d	f1,j1
160.7 & 163.1	d	h1
168.7	s	a1

【0 2 1 1】

表9 及び表10 に示す通り、当該PHAは3-ヒドロキシ-4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]酪酸をモノマーユニットとして含む、化学式(27)に示すPHAであることが確認された。また得られたPHAは、NMRより3-ヒドロキシ-4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]酪酸のモノマーユニットを 79.5mol%含むことがわかった。

【0 2 1 2】

【化 8 8】



【0 2 1 3】

また、得られたPHAの分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC; 東ソーHLC-8220、カラム; 東ソーTSK-GEL SuperHM-H、

溶媒；クロロホルム、ポリスチレン換算)により評価した結果、 $M_n=19800$ 、 $M_w=41500$ であった。

【0214】

[実施例9]

D-グルコース 0.5%、FTPxBA 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シェードモナス・チコリアイ・H45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。96時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース 0.5%、FTPxBA 0.1%を含む、窒素源(NH_4Cl)を含まないM9培地 200mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。72時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0215】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径 $0.45\mu m$ のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを4mg得た。

【0216】

得られたPHAは、実施例8と同様の条件でNMR分析を行なった結果、得られたPHAは、NMRより3-ヒドロキシ-4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]酪酸のモノマーユニットを 78.9mol%含むことがわかった。

【0217】

[実施例10]

D-グルコース 0.5%、FTPxBA 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シェードモナス・ジェッセニイ・P161株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。96時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース 0.5%、FTPxBA 0.1%を含む、窒素源(NH_4Cl)を含まないM9培地 200mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。72時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0218】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌し

て P H A を抽出した。抽出液を孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して P H A を 6 mg 得た。

【 0 2 1 9 】

得られた P H A は、実施例 8 と同様の条件で N M R 分析を行なった結果、得られた P H A は、N M R より 3-ヒドロキシ-4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]酪酸のモノマーユニットを 73.4mol% 含むことがわかった。

【 0 2 2 0 】

[実施例 11]

ポリペプトン(販売元 和光純薬工業) 0.5%、F T P x B A 0.1% とを含む M 9 培地 200 mL に、シュードモナス・チコリアイ・Y N 2 株を植菌し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、ピルビン酸ナトリウム 0.5%、F T P x B A 0.1% を含む、窒素源(NH_4Cl)を含まない M 9 培地 200 mL に再懸濁して、更に、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。47 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【 0 2 2 1 】

この凍結乾燥ペレットを 20 mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して P H A を抽出した。抽出液を孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して P H A を 70 mg 得た。

【 0 2 2 2 】

得られた P H A は、実施例 8 と同様の条件で N M R 分析を行なった結果、得られた P H A は、N M R より 3-ヒドロキシ-4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]酪酸のモノマーユニットを 65.7mol% 含むことがわかった。

【 0 2 2 3 】

[実施例 12]

ポリペプトン(販売元 和光純薬工業) 0.5%、F T P x B A 0.1% とを含む M 9 培地 200 mL に、シュードモナス・チコリアイ・H 45 株を植菌し、30℃、125 スト

ローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、ピルビン酸ナトリウム 0.5%、F T P x B A 0.1%を含む、窒素源(NH_4Cl)を含まない M 9 培地 200 mL に再懸濁して、更に、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。47時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【 0 2 2 4 】

この凍結乾燥ペレットを 20 mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して P H A を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μm のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して P H A を 6 mg 得た。

【 0 2 2 5 】

得られた P H A は、実施例 8 と同様の条件で N M R 分析を行なった結果、得られた P H A は、N M R より 3-ヒドロキシ-4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]酪酸のモノマーユニットを 53.7 mol% 含むことがわかった。

【 0 2 2 6 】

[実施例 13]

ポリペプトン(販売元 和光純薬工業) 0.5%、F T P x B A 0.1% とを含む M 9 培地 200 mL に、シュードモナス・ジェッセニイ・P 161 株を植菌し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、ピルビン酸ナトリウム 0.5%、F T P x B A 0.1% を含む、窒素源(NH_4Cl)を含まない M 9 培地 200 mL に再懸濁して、更に、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。47時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【 0 2 2 7 】

この凍結乾燥ペレットを 20 mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して P H A を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μm のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して P H A を 7 mg 得た。

【 0 2 2 8 】

得られた P H A は、実施例 8 と同様の条件で N M R 分析を行なった結果、得られた P H A は、N M R より 3-ヒドロキシ-4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]酪酸のモノマーユニットを 35.8mol% 含むことがわかった。

【 0 2 2 9 】

[実施例 14]

グルタミン酸ナトリウム 0.5%、F T P x B A 0.1% とを含む M 9 培地 200mL に、シュードモナス・チコリアイ・Y N 2 株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【 0 2 3 0 】

この凍結乾燥ペレットを 20mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌して P H A を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して P H A を 14mg 得た。

【 0 2 3 1 】

得られた P H A は、実施例 8 と同様の条件で N M R 分析を行なった結果、得られた P H A は、N M R より 3-ヒドロキシ-4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]酪酸のモノマーユニットを 18.7mol% 含むことがわかった。

【 0 2 3 2 】

[実施例 15]

ポリペプトン(販売元 和光純薬工業) 0.5%、F T P x B A 0.1% とを含む M 9 培地 200mL に、シュードモナス・チコリアイ・Y N 2 株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【 0 2 3 3 】

この凍結乾燥ペレットを 20mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌して P H A を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して P H A を 6mg 得た。

【 0 2 3 4 】

得られた P H A は、実施例 8 と同様の条件で N M R 分析を行なった結果、得られた P H A は、N M R より 3-ヒドロキシ-4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]酪酸のモノマーユニットを 44.6mol% 含むことがわかった。

【 0 2 3 5 】

[実施例16]

酵母エキス 0.5%、F T P x B A 0.1% とを含む M 9 培地 200mL に、シュードモナス・チコリアイ・Y N 2 株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【 0 2 3 6 】

この凍結乾燥ペレットを 20mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌して P H A を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して P H A を 10mg 得た。

【 0 2 3 7 】

得られた P H A は、実施例 8 と同様の条件で N M R 分析を行なった結果、得られた P H A は、N M R より 3-ヒドロキシ-4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]酪酸のモノマーユニットを 56.8mol% 含むことがわかった。

【 0 2 3 8 】

[実施例17]

n-ノナン酸 0.1%、F T P x B A 0.1% とを含む M 9 培地 200mL に、シュードモナス・チコリアイ・Y N 2 株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【 0 2 3 9 】

この凍結乾燥ペレットを 20mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌して P H A を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ

、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して P H A を 38mg 得た。

【 0 2 4 0 】

得られた P H A は、実施例 8 と同様の条件で N M R 分析を行なった結果、得られた P H A は、N M R より 3-ヒドロキシ-4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]酪酸のモノマーユニットを 5.2mol% 含むことがわかった。

【 0 2 4 1 】

[実施例 18]

n-オクタン酸 0.1%、F T P x B A 0.1% とを含む M 9 培地 200mL に、シュードモナス・チコリアイ・Y N 2 株を植菌し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【 0 2 4 2 】

この凍結乾燥ペレットを 20mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して P H A を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して P H A を 34mg 得た。

【 0 2 4 3 】

得られた P H A は、実施例 8 と同様の条件で N M R 分析を行なった結果、得られた P H A は、N M R より 3-ヒドロキシ-4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]酪酸のモノマーユニットを 6.0mol% 含むことがわかった。

【 0 2 4 4 】

表 11 は、実施例 8 ～ 18 における菌体乾燥重量、ポリマー乾燥重量、ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量及び得られたポリマーの 3 H T P x B ユニットの mol% を示したものである。

【 0 2 4 5 】

【表 1 1】

表11				
	乾燥菌体重量 (mg/L)	乾燥ポリマー 重量(mg/L)	菌体重量/ ポリマー重量(%)	3HTPxB ユニットmol%
実施例8	720	320	44.4	79.5
実施例9	435	20	4.6	78.9
実施例10	390	30	7.7	73.4
実施例11	920	350	38.0	65.7
実施例12	470	30	6.4	53.7
実施例13	405	35	7.4	35.8
実施例14	785	90	11.5	18.7
実施例15	575	30	5.2	44.6
実施例16	710	50	7.0	56.8
実施例17	410	190	46.3	5.2
実施例18	400	170	42.5	6.0

【0 2 4 6】

[実施例19]

3-ヒドロキシ-5-[(4-スルホフェニル)スルファニル] 吉草酸ユニットを含む
ポリヒドロキシアлкаノエートの製造

ポリペプトン(販売元 和光純薬工業) 0.5%を含むM9培地 200mLに、YN2
株を植菌し、500mL振とうフラスコ中で 30℃、125ストローク/分の条件下で振
とう培養した。6時間後、前記培養液 2 mLを、ポリペプトン 0.5%と5-(フェ
ニルスルファニル)吉草酸 0.1%とを含むM9培地 1000mLに添加し、2000mL振
とうフラスコ中で 30℃、125ストローク/分の条件下で、2本振とう培養した。4
8時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾
燥した。

【0 2 4 7】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌し
てPHAを抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ mのメンブランフィルターで濾過し
た後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ
、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してポリヒドロキシアлкаノエートを 1070
mg 得た。得られたポリヒドロキシアлкаノエートは、以下の条件でNMR分析
を行った。

<測定機器> FT-NMR: Bruker DPX 400

共鳴周波数: $^1\text{H}=400\text{MHz}$

<測定機器> 測定核種: ^1H

使用溶媒: CDCl_3

測定温度:室温

【0248】

その結果、得られたポリヒドロキシアルカノエートは3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルファニル)吉草酸ユニットをモノマーユニットとして含み、且つそれ以外のモノマーユニットが3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸を含む、ポリヒドロキシアルカノエートであることが確認された。また、得られたポリヒドロキシアルカノエートは、3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルファニル)吉草酸ユニットのモノマーユニットを94.7mol%含むことがわかった。

【0249】

100mLナスフラスコに上記のようにして得られた3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルファニル)吉草酸ユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート500mgとクロロホルム35mLを予め仕込み、温度を0℃とした。そこへ、クロロ硫酸1.80mL(27.0mmol)を反応温度0℃に保ちながら、少しずつ滴下した。同温度で2時間攪拌した後、不溶した反応生成物を濾過により取り出した。反応生成物を300mL氷水中で攪拌した後、濾取し、メタノールにより洗浄を行った。濾過後、乾燥することでスルホン酸が導入された3-ヒドロキシ-5-[(4-スルホフェニル)スルファニル]吉草酸ユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート230mgを得た。

【0250】

得られた化合物は、以下の条件でNMR分析を行った。

<測定機器> FT-NMR: Bruker DPX 400

共鳴周波数: $^1\text{H}=400\text{MHz}$

<測定機器> 測定核種: ^1H

使用溶媒: $\text{DMSO}-d_6 + 5\% \text{D}_2\text{O}$

測定温度: 40°C +

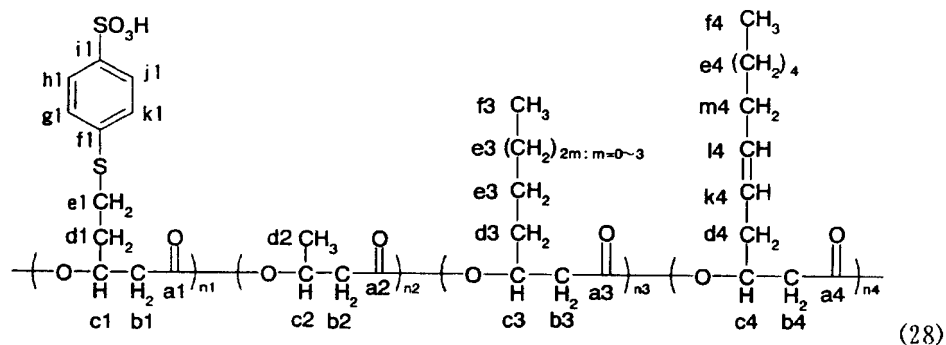
¹H-NMR スペクトルチャートの同定結果を表12 に示す。

【0251】

また本PHAを更にフーリエ変換-赤外吸収(FT-IR)スペクトル(Nicolet AVATAR 360 FT-IR)により分析を行ったところ、1169cm⁻¹に新たにスルホン酸による吸収が見られた。この結果から、3-ヒドロキシ-5-[(4-スルホフェニル)スルファニル]吉草酸ユニットを含む化学式(28)に示すPHAであることが確認された。

【0252】

【化89】



【0253】

【表12】

表12: ¹H-NMRスペクトル同定結果

Chemical shift (ppm)	積分比	分裂	同定結果
1.63 ~ 1.82	2	br	d1
2.54 ~ 2.63	2	br	b1
2.87 ~ 3.04	2	br	e1
5.16	1	br	c1
7.24	2	d	h1,j1
7.51	2	d	g1,k1

【0254】

[実施例20]

3-ヒドロキシ-6-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル]ヘキサン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートのポリヒドロキシアルカノエートの製造

n-ノナン酸 0.1%、8-ブロモオクタン酸(東京化成)0.1%とを含むM9培地4Lを2L容振とうフラスコ4本に1Lずつ分け、それぞれにシュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。96時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0255】

この凍結乾燥ペレットを100mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを370mg得た。

【0256】

得られたPHAは、以下の条件でNMR分析を行なった。

<測定機器> FT-NMR: Bruker DPX 400

共鳴周波数: ^1H = 400 MHz, ^{13}C = 100MHz

<測定機器> 測定核種: ^1H

使用溶媒: CDCl_3

測定温度: 室温

【0257】

^1H -NMRスペクトルにおいて、3.4ppm付近に側鎖末端- CH_2Br のプロトンに由来するピークが見られ、その積分比から末端ブロモ基を有するユニットの割合は32mol%であることがわかった。

【0258】

また、 ^{13}C -NMRスペクトルにおいて、側鎖末端メチンのピークが、n-ノナン酸から合成される直鎖3-ヒドロキシアルカン酸ユニットに由来するピーク(70.8ppm)以外に、60.8ppm及び70.6ppmにピークが見られ、それぞれ3-ヒドロキシ-6-ブロモヘキサン酸ユニット及び3-ヒドロキシ-8-ブロモオクタン酸ユニットに由来すると考えられた。

【0259】

以上の結果より、得られたPHAは3-ヒドロキシ-6-ブロモヘキサンユニット酸及び3-ヒドロキシ-8-ブロモオクタン酸ユニットを合わせて32mol%含むPHAであることが示された。

【0260】

このPHAを3mLのDMFに溶解し、200mgの4-メルカプト安息香酸(東京化成)を1mLのDMFに溶解させた溶液を加え、攪拌しながら150 μ Lのジエチルアミンを滴下した。室温で24時間攪拌した後、反応液を氷塊に加え、氷塊がほぼ水になったところで攪拌しながら希塩酸を滴下した。得られた沈殿を遠心分離により回収し、室温で減圧乾燥した後、再度3mLのDMFに溶解し、溶液を氷塊に加え、氷塊がほぼ水になったところで攪拌しながら希塩酸を滴下した。得られた沈殿を遠心分離により回収し(この際、粉体状で析出する未反応の4-メルカプト安息香酸を注意深く除去した)、室温で減圧乾燥した得られたPHAは260mgであった。

【0261】

得られたPHAを、以下の条件で ^1H -NMR分析した。

<測定機器> FT-NMR: Bruker DPX 400

共鳴周波数: ^1H = 400MHz

<測定機器> 測定核種: ^1H

使用溶媒: DMSO- d_6 + 5% D_2O

測定温度: 40°C +

【0262】

7.2ppm及び7.8ppm付近に芳香環オルト位及びメタ位のプロトンの等価なピークがみられ、また3.4ppm付近の側鎖末端- CH_2Br のプロトンに由来するピークが消失し、-S- CH_2 -構造のメチレン部分のプロトンに由来するピークが2.9ppm付近に出現した。またピークの積分比から芳香環を有するユニットの比率は35mol%であると計算された。

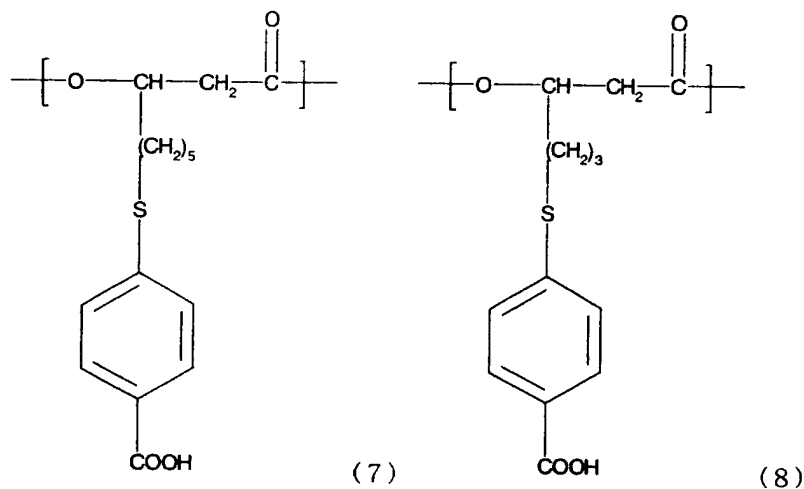
【0263】

また本PHAを更に実施例19と同様にFT-IRにより分析を行ったところ、1

685 cm^{-1} にカルボン酸に由来する吸収が見られた。以上の結果より、得られたPHAは化学式(7)に示す、3-ヒドロキシ-8-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル]オクタン酸ユニット、化学式(8)に示す、3-ヒドロキシ-6-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル]ヘキサン酸ユニットを分子中に含んでいることが明らかとなった。

【0264】

【化90】



【0265】

[実施例21]

振盪フラスコに3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸を1.0694g、8-ブromoオクタン酸(東京化成)を0.6693g、ポリペプトン(販売元 和光純薬工業)を5.0gとり、M9培地1000mLをいれて、バイオシリコで栓をし、120℃で10分間オートクレーブを用いて加熱滅菌した。室温まで冷却したのち、準備しておいた菌液(ポリペプトン0.5%入りM9溶液にシュドモナス・チコリアイP161株を植菌し8時間プレ培養したもの)5mLを加えて、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。72時間後、菌体を遠心分離により回収し、メタノールで洗浄し、真空ポンプで乾燥させた。

【0266】

さらに、この乾燥させた菌体を、適量のクロロホルムに懸濁させて室温で72

時間攪拌することにより、PHAを抽出した。この抽出液を孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過した後、ロータリーエバポレーターを用いて濃縮し、濃縮液をメタノール中で再沈殿させた。得られたポリマーを真空乾燥させポリマー収量を測定したところ、 254mg/L であった。

【0267】

得られたPHAは、以下の条件でNMR分析を行なった。

<測定機器> FT-NMR: Bruker DPX 400

共鳴周波数: $^1\text{H} = 400\text{MHz}$, $^{13}\text{C} = 100\text{MHz}$

<測定機器> 測定核種: ^1H

使用溶媒: CDCl_3

測定温度: 室温

【0268】

^1H -NMRスペクトルにおいて、 3.4ppm 付近に側鎖末端- CH_2Br のプロトンに由来するピークが見られ、その積分比から末端ブロモ基を有するユニットの割合は $7\text{mol}\%$ であることがわかった。

【0269】

以上の結果より、得られたPHAは3-ヒドロキシ-6-ブロモヘキサンユニット酸及び3-ヒドロキシ-8-ブロモオクタン酸ユニットを合わせて $7\text{mol}\%$ 含むPHAであることが示された。

【0270】

このPHA 800mg を 3mL のDMFに溶解し、 73mg の4-メルカプト安息香酸(東京化成)を 3mL のDMFに溶解させた溶液を加え、攪拌しながら $49\mu\text{L}$ のジエチルアミンを滴下した。室温で63時間攪拌した後、反応液を氷塊に加え、氷塊がほぼ水になったところで攪拌しながら希塩酸を滴下した。得られた沈殿を遠心分離により回収し、室温で減圧乾燥した後、 20mL のTHFに溶解し、溶液をメタノールに加えた。得られた沈殿を遠心分離により回収し、室温で減圧乾燥した得られたPHAは 250mg であった。

【0271】

得られたPHAを、以下の条件で ^1H -NMR分析した。

＜測定機器＞ F T-NMR: Bruker DPX 400

共鳴周波数: $^1\text{H} = 400\text{MHz}$

＜測定機器＞ 測定核種: ^1H

使用溶媒: DMSO- d_6

測定温度: $40^\circ\text{C} +$

【0272】

7.2ppm及び 7.8ppm付近に化学式(7)に示す、3-ヒドロキシ-8-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル]オクタン酸ユニット、化学式(8)に示す、3-ヒドロキシ-6-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル]ヘキサン酸ユニットの芳香環オルト位及びメタ位のプロトンの等価なピークがみられ、また 3.4ppm付近の側鎖末端- CH_2Br のプロトンに由来するピークが消失し、- $\text{S}-\text{CH}_2$ -構造のメチレン部分のプロトンに由来するピークが 2.9ppm付近に出現した。また、7.1ppm及び 7.2ppm付近に3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸ユニットの芳香環に由来するピークが見られた。

【0273】

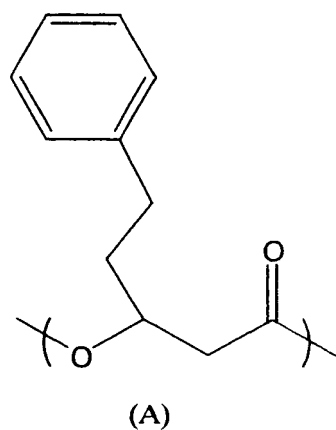
また本PHAを更に実施例19と同様にFT-IRにより分析を行ったところ、 1695cm^{-1} にカルボン酸に由来する吸収が見られた。

【0274】

以上の結果より、得られたPHAは化学式(A)に示す、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸ユニットを含み、化学式(7)に示す3-ヒドロキシ-8-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル]オクタン酸ユニット、もしくは、化学式(8)に示す3-ヒドロキシ-6-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル]ヘキサン酸ユニットを分子中に含んでいることが明らかとなった。

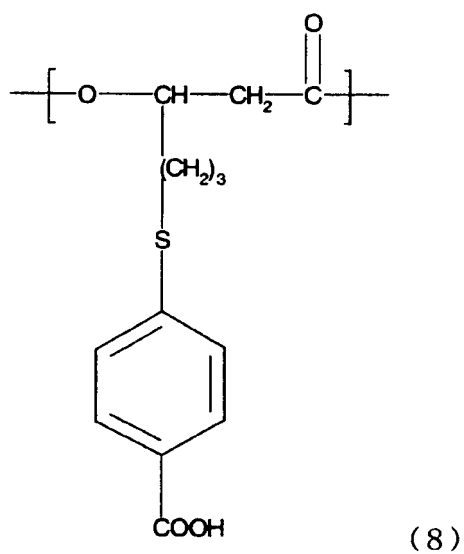
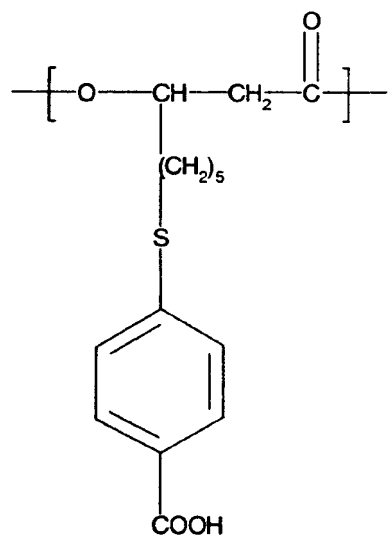
【0275】

【化 9 1】



【 0 2 7 6】

【化 9 2】



【 0 2 7 7】

【発明の効果】

本発明により、側鎖にフェニルスルファニル構造を有するユニット、例えば 3-ヒドロキシ-4-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]酪酸、3-ヒドロキシ-5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]吉草酸、3-ヒドロキシ-5-[(4-スルホ

フェニル)スルファニル] 吉草酸、3-ヒドロキシ-8-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル] オクタン酸、3-ヒドロキシ-6-[(4-カルボキシフェニル)スルファニル] ヘキサン酸をモノマーユニットとして含む新規ポリヒドロキシアлкаノエートが提供される。また、これらのポリヒドロキシアлкаノエートの、微生物を用いて生産する工程を含む製造方法が提供される。

【 0 2 7 8 】

これにより、機能性ポリマーとして有用なポリヒドロキシアлкаノエートが効率的に生産でき、デバイス材料や医薬材料等の各分野への応用が期待できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル] 吉草酸の ^1H -NMRスペクトルチャートである。

【図 2】

実施例 2 により得られた PHA の ^1H -NMRスペクトルチャートである。

【図 3】

実施例 4 により得られた PHA をメタノリシス処理した GC-MS の TIC 及び 3-ヒドロキシ-5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル] 吉草酸メチルの MS スペクトルである。

【図 4】

実施例 8 により得られた PHA の ^1H -NMRスペクトルチャートである。

【図 5】

実施例 8 により得られた PHA の ^{13}C -NMRスペクトルチャートである。

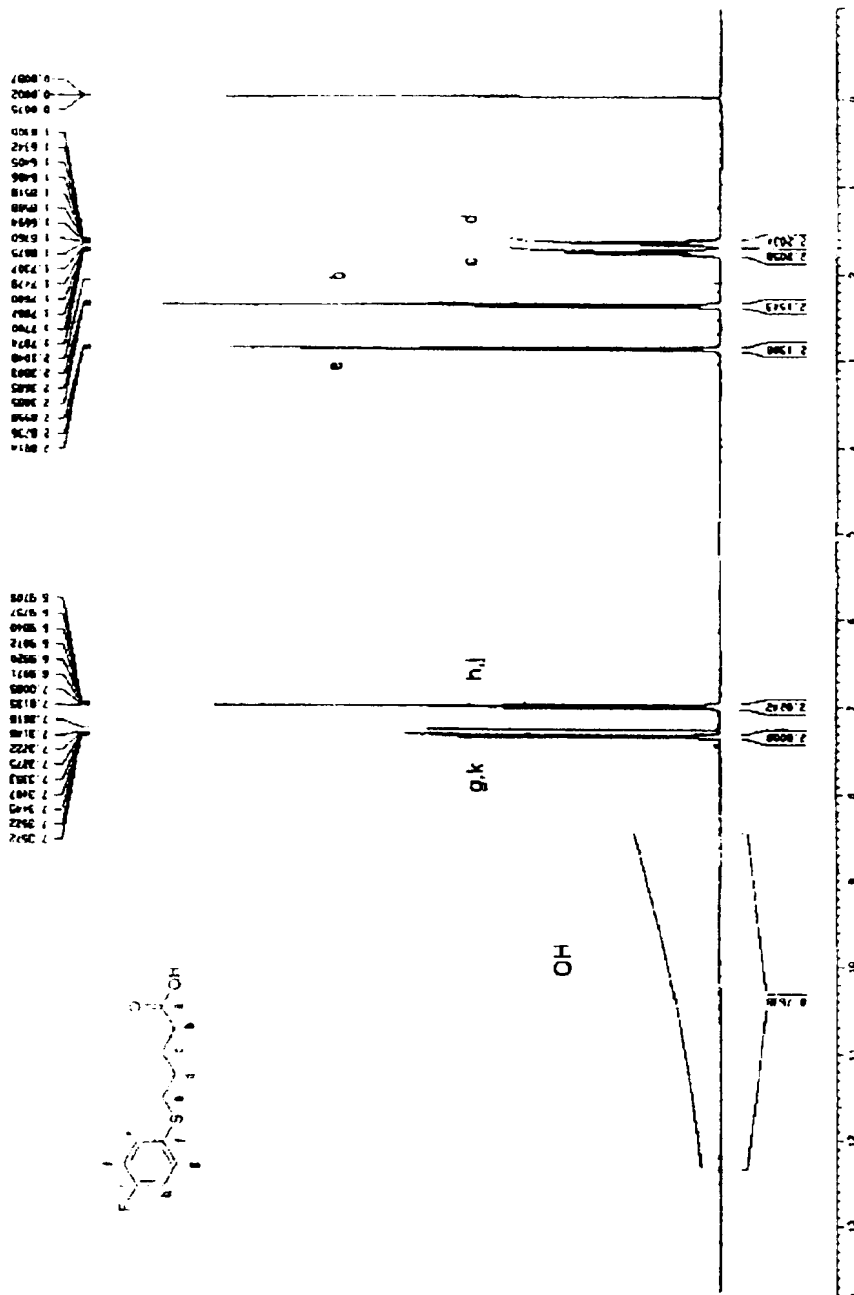
【図 6】

実施例 2 1 により得られた PHA の ^1H -NMRスペクトルチャートである。

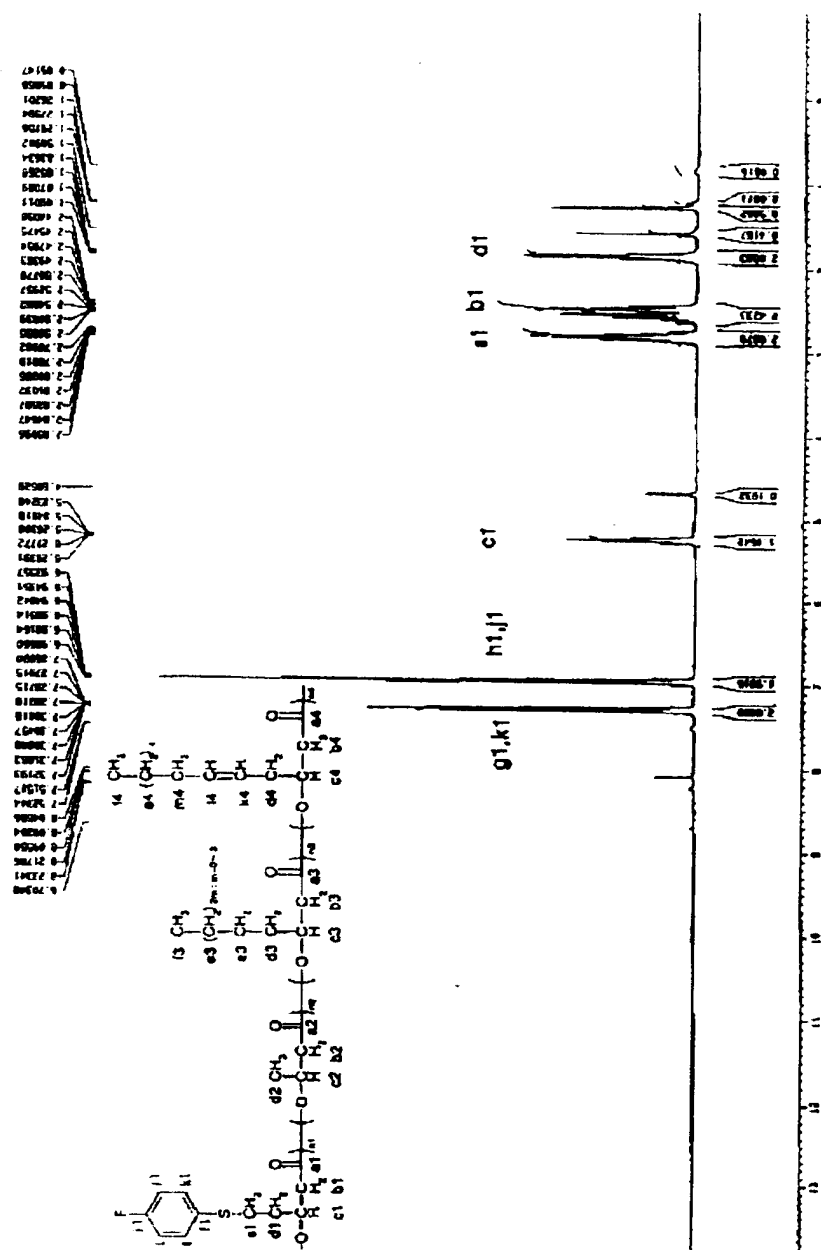
【書類名】

図面

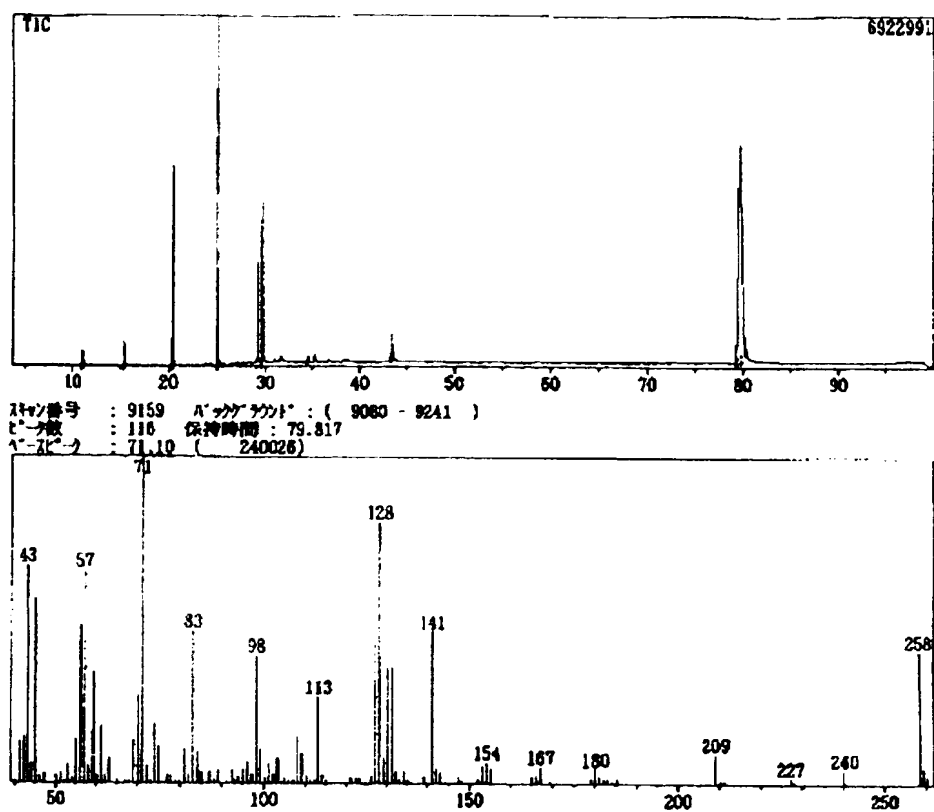
【図 1】



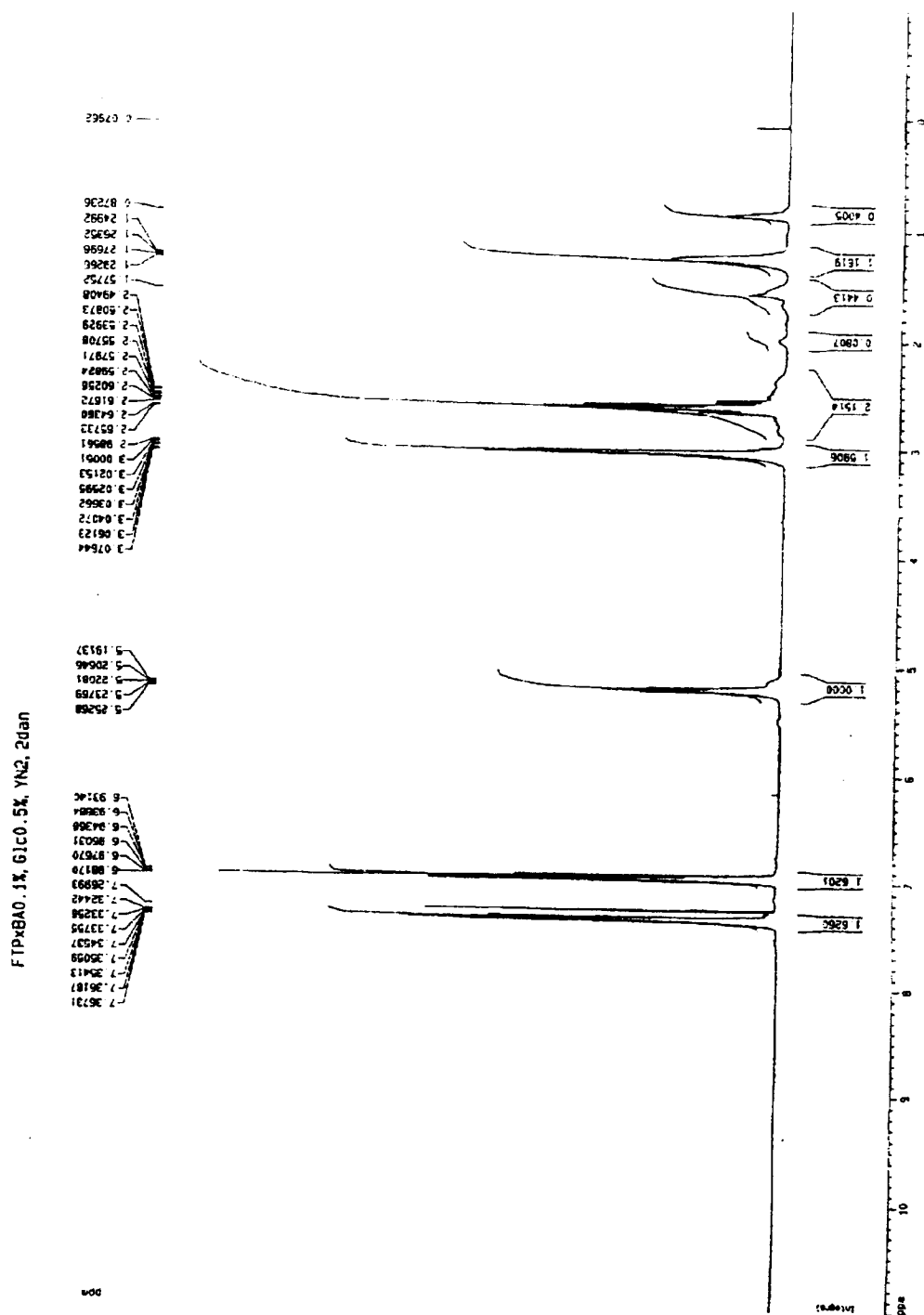
【図 2】



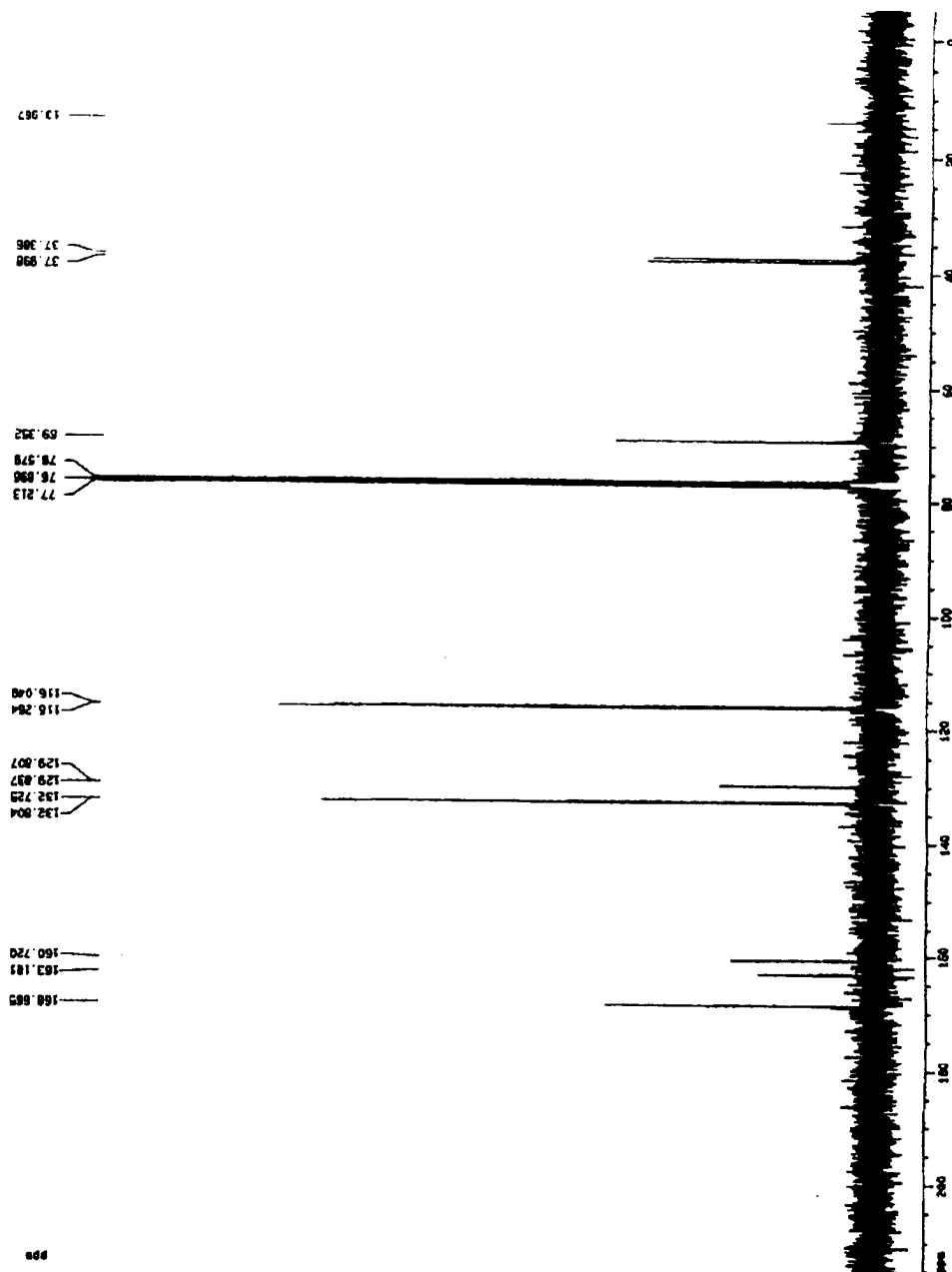
【図 3】



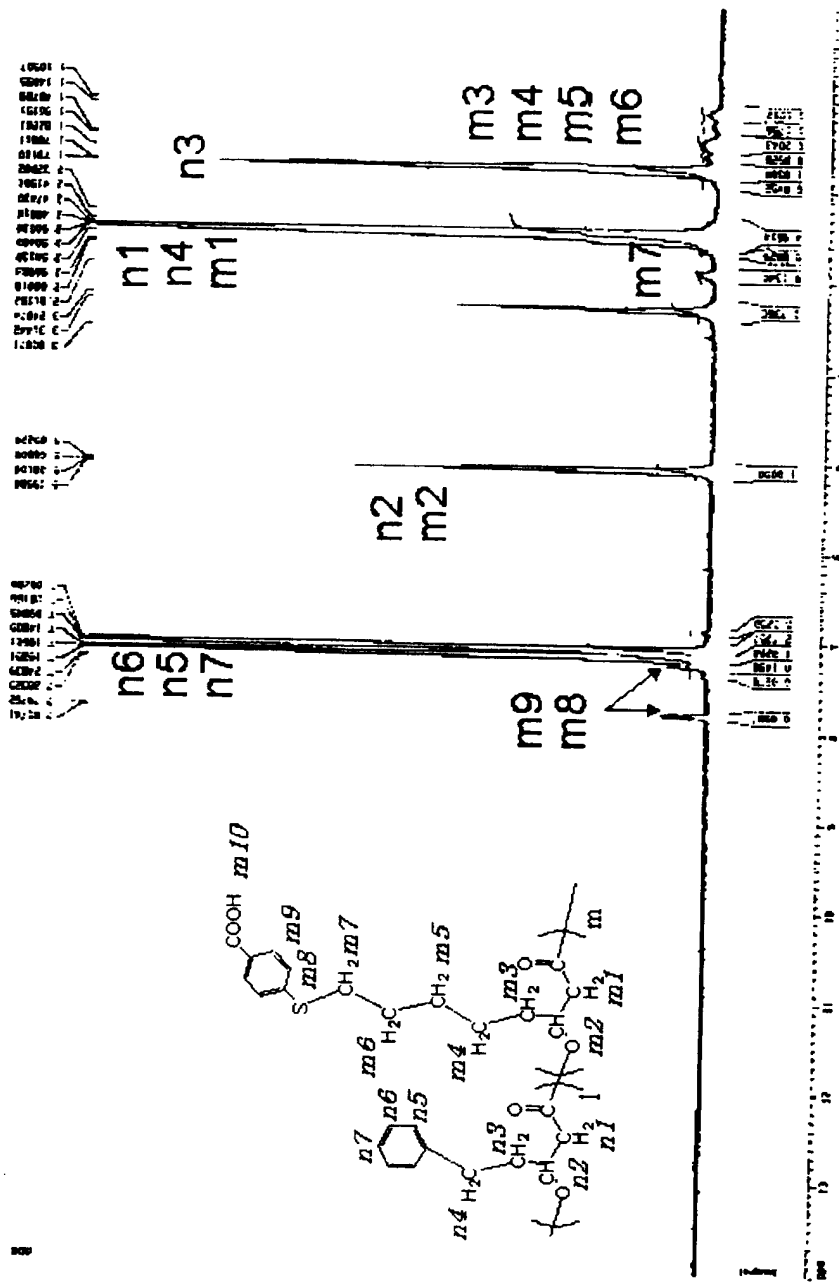
【図4】



【図5】



【図 6】



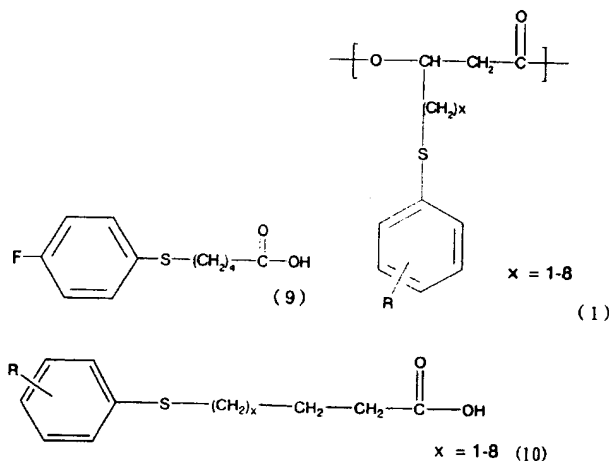
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 チオエーテル構造を有する新規ヒドロキシアルカン酸と、これらの側鎖にチオエーテル構造を有するユニットを含む新規なPHA、およびその製造方法を提供する。

【解決手段】 下記化学式(9)で表される5-[(4-フルオロフェニル)スルファニル]吉草酸。下記化学式(1)で示されるモノマーユニットを含むPHA、さらに化学式(10)で示される化合物を含む培地中で培養した微生物細胞からPHAを回収する工程を含むPHAの製造方法。

【化 1】



但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R'' (R':H,Na,K,CH₃,C₂H₅;R'':OH,ONa,OK,ハロゲン原子,OCH₃,OC₂H₅)」から任意に選択される。また、xは化学式中に示した範囲内で任意の整数値を一つ以上とり得る。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-039254
受付番号	50200211200
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 2月20日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000001007
【住所又は居所】	東京都大田区下丸子3丁目30番2号
【氏名又は名称】	キヤノン株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】	100088328
【住所又は居所】	東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル8階
【氏名又は名称】	金田 暢之

【選任した代理人】

【識別番号】	100106297
【住所又は居所】	東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル8階 若林国際特許事務所
【氏名又は名称】	伊藤 克博

【選任した代理人】

【識別番号】	100106138
【住所又は居所】	東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル8階
【氏名又は名称】	石橋 政幸

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001007]

1. 変更年月日 1990年 8月30日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都大田区下丸子3丁目30番2号

氏 名 キヤノン株式会社